

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Analyse der Funktion des C- Terminus des
Ca_v1.2 L-Typ Calciumkanal *in vitro* und im Mausmodell**

Katrin Domes
aus Schrobenhausen

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10.06.2011.



(Katrin Domes)

Dissertation eingereicht am

10.06.2011

1. Gutachter

Herr Prof. Dr. Franz Hofmann

2. Gutachter

Herr Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am

06.07.2011

Meinem Opa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1. Spannungsabhängige Calciumkanäle	1
1.2. L-Typ Calciumkanäle	3
1.3. Die Bedeutung des Cav1.2 Calciumkanals für das Herz	4
1.4. Der Cav1.2 C-Terminus	5
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	7
2.2. Geräte	8
2.3. Molekularbiologische Methoden	9
2.3.1. Verwendete Plasmide	9
2.3.2. Kultivierung von <i>E.coli</i>	10
2.3.3. Herstellung kompetenter Bakterienzellen	11
2.3.4. Elektroporation von <i>E.coli</i>	11
2.3.5. Alkalische Zellyse	12
2.3.6. Minipräparation	12
2.3.7. Maxipräparation	13
2.3.8. DNS-Fällung	13
2.3.9. Restriktionsverdau	13
2.3.10. Ligation	14
2.3.11. Elektrophoretische Auftrennung von DNS	15
2.3.12. Elektroelution	16
2.3.13. Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe	16
2.3.14. Isolierung von RNS aus Mausgewebe	17
2.3.15. Isolierung von Gesamt-RNS aus Mausgewebe	17
2.3.16. Isolierung von mRNS aus Mausgewebe	18
2.3.17. Synthese von cDNS	19
2.3.18. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
2.3.19. Phenol-Chloroform-Extraktion	19
2.3.20. Polymerase-Kettenreaktion	20
2.3.20.1. Verwendete Polymerasen	20
2.3.20.2. Generierung von Oligonukleotid-Primern	22
2.4. Biochemische Methoden	23
2.4.1. Proteingewinnung mittels SDS/Tris-Auflösung	23
2.4.1.1. Proteingewinnung aus murinem Gewebe	23
2.4.1.2. Proteingewinnung aus HEK 293T-Zellen	23
2.4.2. Quantitative Proteinbestimmung	23
2.4.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	24
2.4.4. Western Blot	27

Inhaltsverzeichnis

2.4.5.	Immuncytologische Methoden	27
2.4.6.	Histologische Methoden	28
2.4.6.1.	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung)	28
2.4.6.2.	Trichromfärbung	29
2.5.	Zellbiologische Methoden	29
2.5.1.	HEK 293T-Zellkultur	29
2.5.2.	Transfektion von HEK 293T-Zellen.....	30
2.5.3.	Primärkultur embryonaler Cardiomyocyten.....	30
2.5.4.	Primärkultur adulter Cardiomyocyten	31
2.6.	Elektrophysiologie.....	33
2.7.	<i>In vivo</i> -Untersuchungen.....	35
2.7.1.	Versuchstierhaltung.....	35
2.7.2.	Konstruktion der Asp1904 Stop-Mauslinie.....	35
2.7.3.	Elektrokardiogramm	37
2.7.3.1.	Einsetzen des EKG-Transmitters	38
2.7.3.2.	EKG-Aufzeichnungen.....	39
2.7.3.3.	EKG-Auswertung.....	39
2.7.4.	Tamoxifen-Injektionen	40
2.7.5.	Messung der Herzmuskelkontraktionskraft.....	40
2.7.6.	Färbung des Ductus botalli	41
2.8.	Statistische Auswertung	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Expression von Cav1.2 Mutanten in HEK 293T-Zellen.....	42
3.1.1.	Herstellung der α_{1c} Mutanten.....	42
3.1.2.	Immunocytochemische Expressionsuntersuchungen	43
3.1.3.	Proteinexpression in HEK 293T-Zellen.....	44
3.1.4.	Proteasominhibitoren.....	46
3.1.5.	LK4Stop-Expression in HEK 293T-Zellen.....	47
3.1.6.	Elektrophysiologie an HEK 293T-Zellen	48
3.1.6.1.	HK1Stop und HK1	48
3.1.6.2.	HK1Stop mit Proteasom-Inhibitor	48
3.1.6.3.	LK1Stop und LK4Stop.....	49
3.2.	<i>In vivo</i> -Untersuchungen der Stop-Mutation	50
3.2.1.	Proteinexpression des Cav1.2 <i>in vivo</i>	51
3.2.2.	mRNS-Untersuchungen <i>in vivo</i>	52
3.2.2.1.	mRNS-Level von Cav1.2.....	52
3.2.2.2.	Ca _v 1.3-Expression in Stop-Embryonen	53
3.2.3.	Spleißvarianten im C-Terminus	53
3.2.4.	Ductus botalli-Färbung	54
3.2.5.	Paraffinschnitte an Herzen E18,5	55
3.2.6.	Elektrokardiogramm an Neugeborenen.....	56
3.2.7.	Messung der kardialen Kontraktionskraft	57

Inhaltsverzeichnis

3.2.8.	Elektrophysiologie an embryonalen Cardiomyocyten	58
3.2.8.1.	Basalmessungen an embryonalen Cardiomyocyten	58
3.2.8.2.	Behandlung embryonaler Cardiomyocyten mit Bortezomib	59
3.3.	Herzspezifische Trunkierung in adulten Mäusen	60
3.3.1.	Generierung gewebsspezifischer Stop-Mäuse	60
3.3.2.	Kaplan-Meier-Überlebensstatistik	61
3.3.3.	Proteinanalyse	62
3.3.3.1.	Proteinanalyse bei Tod	62
3.3.3.2.	Proteinanalyse an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion	63
3.3.4.	Histologische Untersuchungen	64
3.3.4.1.	Morphometrie der Herzen	64
3.3.4.2.	Trichromfärbung	65
3.3.5.	Semiquantitative PCRs auf Hypertrophiemarker	66
3.3.6.	Fractional Shortening	68
3.3.7.	Elektrokardiogramm an herzspezifisch trunkierten Tieren	69
3.3.8.	Untersuchung isolierter Cardiomyocyten	70
3.3.8.1.	Cardiomyocytengröße	70
3.3.8.2.	Ca _v 1.2-Expression in isolierten Cardiomyocyten	71
4.	Diskussion	73
4.1.	Die Trunkierung von Cav1.2 <i>in vivo</i>	73
4.2.	Herzspezifische Trunkierung von Cav1.2	75
4.3.	Trunkierte Cav1.2-Varianten in HEK 293T-Zellen	76
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	81
	Anhang	87
	Danksagung	89
	Lebenslauf	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	3
Abbildung 2.....	10
Abbildung 3.....	36
Abbildung 4.....	43
Abbildung 5.....	43
Abbildung 6.....	44
Abbildung 7.....	45
Abbildung 8.....	45
Abbildung 9.....	46
Abbildung 10.....	47
Abbildung 11.....	47
Abbildung 12.....	48
Abbildung 13.....	49
Abbildung 14.....	50
Abbildung 15.....	51
Abbildung 16.....	52
Abbildung 17.....	52
Abbildung 18.....	53
Abbildung 19.....	54
Abbildung 20.....	55
Abbildung 21.....	56
Abbildung 22.....	57
Abbildung 23.....	57
Abbildung 24.....	58
Abbildung 25.....	59
Abbildung 26.....	59
Abbildung 27.....	60
Abbildung 28.....	61
Abbildung 29.....	62
Abbildung 30.....	63
Abbildung 31.....	64
Abbildung 32.....	65
Abbildung 33.....	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 34.....	67
Abbildung 35.....	68
Abbildung 36.....	70
Abbildung 37.....	71
Abbildung 38.....	72

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BCS	Bovines Kälberserum
BDM	2,3-Butandionmonoxim
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Carboxylterminus von Peptiden und Proteinen
CACNA1C	Gen des Ca _v 1.2-Kanals
CaMKII	Calmodulin-Kinase II
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	Calf intestine phosphatase, Kälberdarm-Phosphatase
d	Tag
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DHP	Dihydropyridine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
F	Farad
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Ortsfaktor
h	Stunde
HEK 293T	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HVA	high voltage activated
Hz	Hertz
I_{Ba}	Bariumeinstrom
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
L1, L2	eine oder zwei loxP-Sequenzen

Abkürzungsverzeichnis

LB	Luria-Bertani
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase
LVA	low voltage activated
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
M	molar, mol/Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minuten
mol	Stoffmenge
n	Nano (10^{-9})
N	Newton
N	Aminoterminus bei Peptiden und Proteinen
NGS	Normal Goat Serum
OD	Optische Dichte
PAA	Phenylalkylamine
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SERCA	Sarko-/Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEA	Tetraethylammoniumion
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Calciumkanäle beeinflussen nahezu alle zellulären Prozesse, angefangen bei der Erregungs-Kontraktionskopplung in Herz- und Skelettmuskeln sowie der glatten Muskulatur über die Gentranskription bis hin zur Zellproliferation. All diesen Prozessen liegt ein transients Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zugrunde, gefolgt von einem raschen Abfall zurück auf den Basalwert (Bootman & Berridge 1995). Während die basalen intrazellulären Calciumkonzentrationen beispielsweise über Natrium-Calcium-Austauscher oder SERCA (**s**mooth muscle **e**ndoplasmic **r**eticular **C**alcium **A**TPase) auf etwa 100nM gehalten werden, kommt es durch die Depolarisation der Zellmembran zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen, wodurch die Calciumionen entlang des 20000-fachen Gradienten zwischen der intrazellulären (etwa 100 nM freies Calcium) und der extrazellulären Calciumkonzentration (im mM Bereich) ins Cytosol einströmen (Clapham 2007). Die Öffnung dieser Calciumkanäle kann auch durch Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen sowie Pharmaka regulatorisch beeinflusst werden (Hofmann et al. 1999, Moosmang et al. 2005). Andererseits können Veränderungen in der Funktion und Expression der Calciumkanäle zu zellulären Störungen und dadurch zu einer Reihe von Erkrankungen führen. Dazu zählen beispielsweise kardiale Erkrankungen wie Arrhythmien und Herzinsuffizienz oder das Timothy-Syndrom, zu dessen Symptomen unter Anderem Autismus gehört.

1.1. Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle gehören zur Gruppe der transmembranären Ionenkanäle, zu der auch spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle zählen. Sie sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteinkomplexe, die sich in die beiden großen Gruppen *high voltage* (HVA) und *low voltage* (LVA) aktivierte Calciumkanäle unterteilen lassen (Yaari et al. 1987). Anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften lassen sich weitere Subtypen unterscheiden.

Die T-Typ-Calciumkanäle lassen sich den LVA-Kanälen zuordnen und zeichnen sich durch ihre geringe (tiny) Leitfähigkeit, eine sehr kurze Öffnungszeit (transient) und ihre Aktivität bei negativeren Membranpotentialen als die L-Typ-Kanäle aus. Sie sind insensitiv gegenüber Dihydropyridinen. Es lassen sich drei Subtypen unterscheiden, die alle in Neuronen zu finden sind, Ca_v3.1 und 3.2 außerdem in Herz- und Glattmuskelzellen (Cribbs et al. 1998, Perez-Reyes 1998).

Einleitung

Die L-Typ-Calciumkanäle gehören zu den HVA-Kanälen. Charakteristisch sind die große Leitfähigkeit (Large conductance), die lange Öffnungszeit (Long lasting opening) bei Verwendung von Barium als Ladungsträger, die hohe Depolarisation der Zellmembran (Large depolarisation), die zu ihrer Aktivierung notwendig ist, und ihre Sensitivität gegenüber Phenylalkylaminen, Benzothiazepinen und Dihydropyridinen. Die L-Typ-Kanäle lassen sich weiter in 4 verschiedene Subtypen unterteilen. $Ca_v1.1$ wird in der Skelettmuskulatur exprimiert (Jongh et al. 1991, Tanabe et al. 1987), $Ca_v1.2$ konnte in mehreren Geweben nachgewiesen werden, nämlich im Gehirn (Hell et al. 1993), im Herzen (Mikami et al. 1989, Striessnig 1999, Welling et al. 1997), der glatten Muskulatur (Moosmang et al. 2003), dem Pankreas (Schulla et al. 2003) und in der Nebenniere. $Ca_v1.3$ wird im Gehirn exprimiert, daneben findet er sich auch im Herz, den Nieren, den Ovarien, dem Pankreas und der Cochlea (Seino et al. 1992). Der $Ca_v1.4$ -Kanal findet sich in der Retina (Strom et al. 1998) sowie dem Lymphgewebe und den Rückenmarksneuronen (McRory et al. 2004).

Zu den HVA Calciumkanälen gehören außerdem die N-Typ-Kanäle, die in Neuronen und neuroendokrinen Zellen zu finden sind (McCleskey et al. 1987, Tsien et al. 1988) genau wie die P/Q-Typ-Kanäle (Mori et al. 1991, Starr et al. 1991). In Neuronen werden zudem R-Typ-Kanäle exprimiert (Jing et al. 2005, Niidome et al. 1992). Diese drei Kanaltypen lassen sich nur durch starke Depolarisation aktivieren und werden nicht durch die zuvor genannten L-Typ Calciumkanalantagonisten inhibiert.

1.2. L-Typ Calciumkanäle

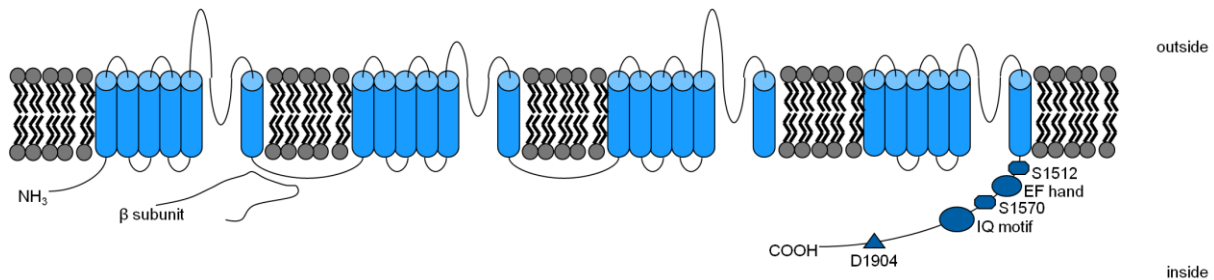


Abbildung 1 Struktur der α_1 -Einheit des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals. Die α_1 -Einheit des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals besteht aus vier identischen transmembranären Domänen, die die porenbildende Struktur darstellen und im jeweils 4. Segment einen Spannungssensor tragen, sowie aus den beiden intrazellulären Domänen, dem N-Terminus und dem langen C-Terminus. Im C-Terminus eingezeichnet sind das EF-Hand- sowie das IQ-Motiv und die beiden potentiellen Phosphorylierungsstellen Serin1512 und Serin1570. Asparaginsäure1904 bezeichnet die hier für die Maus verwendete Trunkierungsstelle.

L-Typ Calciumkanäle bestehen aus einer porenbildenden α_1 -Untereinheit sowie den zwei akzessorischen Untereinheiten β und $\alpha_2\delta$ (siehe Abbildung 1). In Nerven- sowie Skelettmuskelzellen findet man außerdem die γ -Untereinheit, über deren Funktion bislang aber wenig bekannt ist (Catterall 2000, Letts et al. 1998).

Die α_1 -Untereinheit ist der funktionell wichtigste Bestandteil des Kanals und bestimmt seine biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften (Catterall 2000). Hier binden außerdem die Calciumkanalantagonisten vom Typ der Benzothiazepine, Phenylalkylamine und Dihydropyridine (Striessnig 1999), die in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden. Die übrigen Untereinheiten werden als akzessorische Untereinheiten betrachtet, da sie die Expression des Kanals beeinflussen, außerdem die Kinetik und die Amplitude des Calciumeinstroms (Bers 2002, Gao et al. 1999). Sie sind zudem am sogenannten Kanaltrafficking beteiligt, also dem Transport und Einbau des Kanals in die Zellmembran (Shistik et al. 1995). Vor allem der β -Untereinheit wird hier eine wichtige Rolle zugeschrieben.

Die α_1 -Untereinheit besteht aus vier transmembranären Domänen, die homolog sind und sich aus jeweils sechs Segmenten zusammensetzen, die als α -Helices vorliegen. Das jeweils vierte Segment jeder Domäne dient als Spannungssensor des Kanals, der intrazelluläre Loop zwischen den Segmenten 5 und 6 fungiert als Selektivitätsfilter (Guy & Conti 1990).

In der intrazellulären Schleife zwischen Segment 1 und 2 befindet sich die Interaktionsstelle für die β -Untereinheit (Pragnell et al. 1994). Interessant ist der Carboxyterminus, der eine Vielzahl von regulatorischen Strukturelementen beinhaltet, unter ihnen das IQ-Motiv (bestehend aus den Aminosäuren Isoleucin und Glutamin), das Calmodulin binden und so unter Anderem die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals verändern kann (Zühlke et al. 2000), das EF-Hand-Motiv, das Calcium bindet, eine AKAP150-Bindungsstelle, die Interaktionen zwischen dem Calciumkanal und der Proteinkinase A ermöglicht, sowie diverse Phosphorylierungsstellen (Blaich et al. 2010). Dem distalen Teil des C-Terminus wird noch eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription einer Vielzahl von Genen zugeschrieben (Dolmetsch et al. 2001). Eine Vielzahl an Arbeiten zeigt, dass Veränderungen am C-Terminus des $\text{Ca}_v1.2$ die Inaktivierung des Kanals stark beeinflussen (Davare et al. 2001, Fuller et al. 2010, Hulme et al. 2006, Jongh et al. 1996). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des C-Terminus und seiner Bedeutung für den $\text{Ca}_v1.2$ Kanal, welcher auch kardialer Calciumkanal genannt wird und eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Kontraktilität des Herzens hat.

1.3. Die Bedeutung des $\text{Ca}_v1.2$ Calciumkanals für das Herz

In Herzmuskelzellen finden sich ausschließlich Calciumkanäle vom L- und vom T-Typ. Für den Calciumeinstrom während des Aktionspotentials spielen allerdings nur L-Typ-Kanäle eine Rolle. Wie bereits erwähnt gilt der $\text{Ca}_v1.2$ Calciumkanal als der kardiale Kanal, durch den während der systolischen Phase der Herzkontraktion Calcium in die Zelle einströmen kann. Dies geschieht durch eine Öffnung der Calciumkanäle nach Depolarisation der Zellmembran für etwa 100 ms. Die Calciumionen strömen entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle ein und lösen dadurch eine Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern aus. Das sarkoplasmatische Retikulum setzt Calciumionen über seine Ryanodin-Rezeptoren frei und ermöglicht so einen initialen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration von 100 nM auf 10 μM (Bers 2002). Dieser Anstieg führt zur Kontraktion der Zelle, indem Calciumionen an Troponin binden, was eine Konformationsänderung verursacht und so die Blockade der Myosinbindungsstellen am Aktinfilament löst. Durch das Umklappen der Myosinköpfe unter ATP-Beteiligung werden die Aktinfilamente verschoben, dadurch kommt es zur Kontraktion der Herzmuskelzelle.

In der nachfolgenden diastolischen Relaxationsphase werden die Calciumionen über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus dem Zytosol in den Extrazellularraum gepumpt, beziehungsweise über eine Calcium-ATPase zurück in das sarkoplasmatische Retikulum (Bers 2002).

Die bedeutende Rolle des $\text{Ca}_v1.2$ konnte bereits in einem knock-out-Mausmodell bestätigt werden: durch Ausschaltung des *CACNA1C*-Gens, das für den $\text{Ca}_v1.2$ codiert, konnte sich der homozygote Mausembryo nur bis maximal Tag 14 p.c. entwickeln und starb dann (Seisenberger et al. 2000, Xu et al. 2003). Der $\text{Ca}_v1.2$ scheint somit essentiell für die Entwicklung des Mausembryos zu sein.

1.4. Der $\text{Ca}_v1.2$ C-Terminus

Der intrazellulär im Cytoplasma gelegene distale Teil des $\text{Ca}_v1.2$ C-Terminus umfasst die Aminosäuren 1642 bis 2143 und macht mit einer Größe von etwa 75 kDa einen sehr großen und funktionell bedeutenden Teil des Kanals aus. Neben mehreren Phosphorylierungsstellen wie Serin1928 und Bindungsstellen für Ca^{2+} -abhängige Proteine wie Calmodulin, die an der Regulation des Kanals beteiligt sind, spielt der C-Terminus auch eine wichtige Rolle im Membran-Targeting des Kanals, also dem Transport und Einbau des $\text{Ca}_v1.2$ -Proteins vom endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass ein C-terminales Fragment des Kanals in den Zellkern wandert, dort an nukleäre Proteine bindet und so über einen endogenen Promotor die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren kann (Dolmetsch et al. 2001, Gomez-Ospina et al. 2006). Bereits 1994 zeigten Wei et al., dass eine Trunkierung des Kanals an Position 1642 nicht zur Bildung eines funktionsfähigen Kanalproteins führt (Wei et al. 1994). Dagegen konnten Gao et al. nachweisen, dass eine Trunkierung des Kanals an Position 1905 sowohl zu einer Proteinexpression als auch zu einem im Vergleich zum Wildtypkanal vergrößerten Bariumstrom in HEK-Zellen führt, der durch Coexpression eines C-terminalen Fragments mit dem trunkierten Konstrukt wieder auf Wildtypniveau gesenkt werden konnte, was auf eine inhibitorische Funktion des C-Terminus auf den durch $\text{Ca}_v1.2$ vermittelten Calciumstrom hindeutet (Gao et al. 2000, Gao et al. 2001). Sowohl in der Fazilitierung als auch in der Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ spielt auch der Carboxyterminus des Kanals eine wichtige Rolle (Gao et al. 2000, Gao et al. 2001). Bei der Inaktivierung sind es einerseits ein Ca^{2+} abhängiger, andererseits ein spannungsabhängiger Prozess, die zum Schließen des Kanals führen.

Der Ca^{2+} -abhängige Inaktivierungsprozess wird dabei wiederum durch den C-Terminus vermittelt, indem Calmodulin an das dort gelegene IQ-Motiv bindet. Auch in der Ca^{2+} -abhängigen Fazilitierung spielen die Bindung von Calmodulin und Calmodulinkinase II an den Carboxyterminus eine wichtige Rolle. Die spannungsabhängige Fazilitierung beruht auf einer Calmodulinkinase II -abhängigen Phosphorylierung an den Positionen S1512 und S1570 (Blaich et al. 2010). Dass Modifizierungen des $\text{Ca}_v1.2$ am Carboxyterminus eine Veränderung im Inaktivierungsverhalten des Kanals hervorrufen, wurde bereits vielfach gezeigt (Davare et al. 2001, Fuller et al. 2010, Hulme et al. 2006, Jongh et al. 1996, Zühlke et al. 1999).

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl bereits viel über den Carboxyterminus bekannt ist, beruhen viele Daten über seine regulatorischen und inhibitorischen Funktionen rein auf *in vitro*-Experimenten. Daneben konnte das von Dolmetsch et al. (Dolmetsch et al. 2001) propagierte C-Terminusfragment, das *in vivo* vom Kanal abgespalten und in den Nucleus transloziert werden soll, respektive das trunkierte Kanalprotein in verschiedenen Mausgeweben nie detektiert werden. Um zu untersuchen, wie sich die Trunkierung des $\text{Ca}_v1.2$ Calciumkanals *in vivo* auswirkt, sollte eine Mauslinie charakterisiert werden, bei der durch Einführung dreier Stopcodons hinter Position Aspartat 1904 die Translation der inhibitorischen Domäne des Kanals unterbunden wird. Parallel dazu sollten unterschiedliche Isoformen und Mutanten des $\text{Ca}_v1.2$ in HEK-Zellexperimenten untersucht werden, um die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen damit zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien bei Sigma-Aldrich, Carl Roth, Sarstedt, Biochrom und Merck bezogen.

Beschreibung	Bezugsquelle
Agarose	Biozym
Aquasonic 100 Ultraschallgel	Parker Laboratories
Aquatex	Merck
BC Assay Protein Quantification Kit	Uptima
Bortezomib	LC Laboratories
Collagenase Typ II	Worthington
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science
DePex Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific
DMEM	Invitrogen
DynaBeads	Dynal
ECL Advanced Western Blot Detection Kit	GE Healthcare
Fötales Kälberserum	Gibco
Heparin 10000 I.E.	Braun
Isofluran Forene	Abbott
Isotone Kochsalzlösung	Braun
Lactacystin	Calbiochem
Liberase DH	Roche Applied Science
Lipofektamin	Invitrogen
MG132	Calbiochem
Normal Goat Serum	Vector Laboratories
OptiMEM	Gibco
Penicillin-Streptomycin 100x	Gibco
peqGOLD RNA Pure Kit	Peqlab
PermaFluor Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Proteinase K	Roche Applied Science
Quantum 286 Medium	PAA
Standardmarker DNA-Extension-ladder	Gibco
Standardmarker Precision Blue Protein Standard	Gibco
Trypsin-EDTA 10x	Gibco

2.2. Geräte

Gerät	Hersteller
4°C Kühlschrank	Liebherr
-20°C Tiefkühler	AEG
-86°C Tiefkühler HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific
Agarosegelkammer	MWG Biotech
Akku-Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences
Analysenwaage APX-60	Denver Instrument
AxioCam MRc5	Zeiss
BioPhotometer plus	Eppendorf
Brutschrank Binder CB53	Binder
CertomatR (Bakterienkulturschüttler)	Braun
EKG-Transmitter TA10EA-F20	Data Sciences International
Elektroelutionskammer	Werkstatt Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München
Data Exchange Matrix für EKG	Data Sciences International
Geldokumentation Felix 1050	Biostep
GenePulser Elektroporator	Biorad
LAS-4000 mini Chemilumineszenzdetektor	Fujifilm
LSM 510 Axiovert	Zeiss
MiniProtean Tetracell Gelkammer und Zubehör	Biorad
Minipuls 2 Peristaltikpumpe	Abimed
Mikroskop Stemi SV6	Zeiss
Mikroskop Axioskop	Zeiss
Multifunktionsmischer Roto-Shake Genie	Carl Roth
Multiskan FC Fotometer	Thermo Fisher Scientific
Muskelstreifenmyograph 620M	DMT
NanoDrop ND-1000	Peqlab
PCR-Maschine Biometra T Gradient	Biometra
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
PhysioTel Receiver RMC-1 für EKG-Transmitter	Data Sciences International
Pipettierhilfe Pipetman (10, 20, 200, 1000)	Gilson
Potter Typ RM4	Janke Kunkel KG
Präzisionswaage Sartorius MC 1 LC 1200S	Sartorius
Schüttler Unitwist 3D	UniEquip
Semi-Dry-Blotter Maxi	Carl Roth

Gerät	Hersteller
Standard Powerpack P25 Spannungsquelle	Biometra
Sterilbank NuAire ClassII Type A/B3	Heraeus
Thermomixer Compact	Eppendorf
Trockenschrank 37°C	Memmert
Vacuum Concentrator	Bachofer
Vevo 770 Ultraschallgerät	Visual Sonics
Vortex-Mixer	NeoLab
Wasserbad Haake GH Thermobad mit Thermostat D8	Haake
Wasserbad MT/2	Mgw Lauda
Zentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge	Neolab

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Verwendete Plasmide

pcDNA3 (Invitrogen)

Der pcDNA3-Vektor wurde zur Expression der verschiedenen Ca_v1.2-Konstrukte in HEK293T Zellen verwendet. Die zu exprimierende cDNS wurde dazu in die Multiple Cloning Site des Vektors eingebaut und unter dem Cytomegalovirus-Promotor exprimiert. Außerdem trägt der Vektor ein Ampicillin- und ein Neomycin-Resistenzgen. Abbildung 2 zeigt die Vektorkarte von pcDNA3 und die Sequenz seiner Multiple Cloning Site.

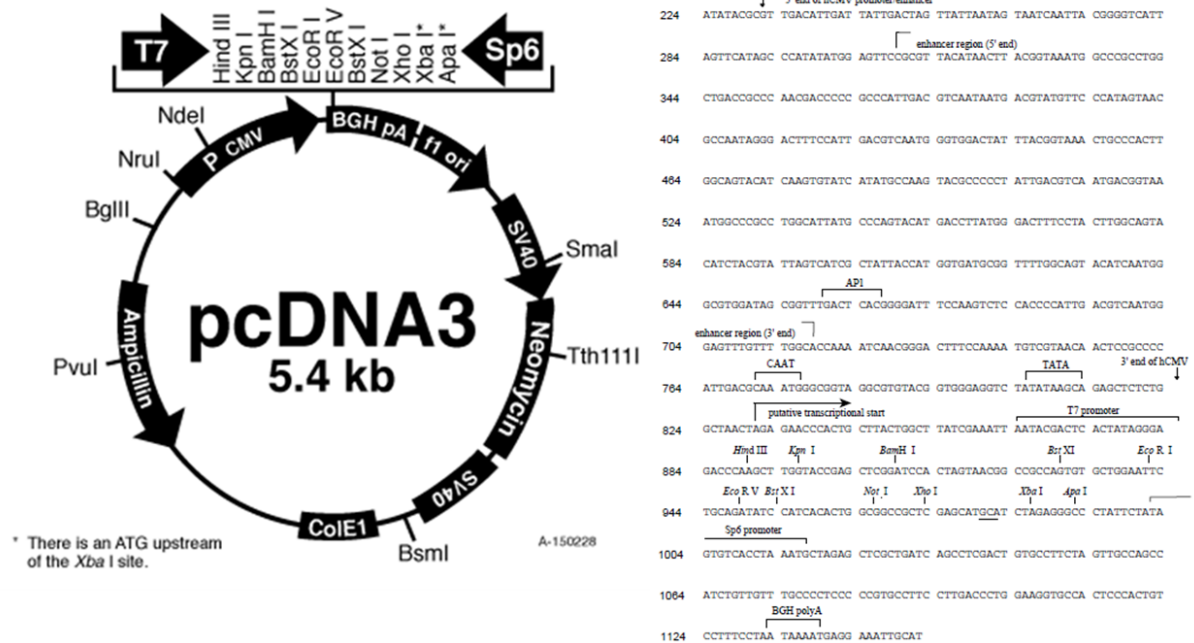


Abbildung 2 Links: Vektorkarte des pcDNA3-Vektors; Rechts: Sequenz der Multiple Cloning Site des pcDNA3-Vektors mit den Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

2.3.2. Kultivierung von *E.coli*

Verwendet wurde der Stamm XL1-Blue (Stratagene), kultiviert in Luria-Bertani-Nährmedium, das mit Glucose angereichert wurde, sogenanntes LB⁺-Nährmedium. Die Selektion von erfolgreich mit Plasmid transformierten *E.coli*-Kolonien erfolgte mit Ampicillin, das dem Medium zugegeben wurde (Endkonzentration 100 µg/ml). Die Ampicillin-Stocklösung wurde mit Wasser in einer Konzentration von 50 mg/ml hergestellt und bei -20°C gelagert. Für die Erzeugung von Einzelkolonien wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin-Agarplatten (Ampicillin-Endkonzentration 50 µg/ml, zugesetzt nach dem Autoklavieren des Plattenmediums bei ca. 50°C) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 225 rpm bebrütet. Die Agarplatten können einige Wochen bei 4°C gelagert werden, zur längerfristigen Lagerung eines Bakterienklons wurden Glycerol-Stocks angefertigt, für die ein Aliquot einer Flüssigkultur 1:1 mit sterilem Glycerol 85% gemischt und bei -80°C gelagert wurde. Nach einer Elektroporation wurde zur Resuspendierung der Zellen SOC(+)-Medium verwendet, das aus SOC(-)-Medium (Lagerung bei -20°C) durch Zugabe von 50 µl MgSO₄ (1 M), 50 µl MgCl₂ (1 M) und 100 µl Glucose 20% hergestellt wurde.

LB-Medium + Glucose	
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH	7,2-7,5

SOC(-) Medium	
Trypton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl (5 M)	0,2 ml
KCl (1 M)	0,25 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

LB-Agar + Glucose	
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH	7,2-7,5

Alle Nährmedien wurden nach der Herstellung autoklaviert.

2.3.3. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen ließ man eine XL1-blue-Kultur wachsen, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 erreicht war und zentrifugierte anschließend ab. Das Bakterienpellet wurde mehrfach mit autoklaviertem Wasser und 10% Glycerol gewaschen, in 10% Glycerol resuspendiert und in 50 µl - Aliquots bei -80°C gelagert.

2.3.4. Elektroporation von *E.coli*

Als Elektroporation bezeichnet man die Transformation, also das Einbringen von Fremd-DNS in Bakterienzellen, durch Anlegen einer hohen Spannung, welche die Zellmembran der Bakterien für die DNS durchlässig macht. Zur Elektroporation wurde der Gene Pulser (BioRad) verwendet. Die elektrokompenten Zellen wurden nach dem Auftauen auf Eis mit dem DNS-Ansatz vorsichtig vermischt, eine weitere Minute auf Eis inkubiert und in eine sterile Elektroporationsküvette überführt. Der Elektroporationspuls wurde mit 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω appliziert. Anschließend wurde sofort 1 ml SOC(+)-Medium zugegeben und die Zellen in einem sterilen Kulturröhrchen für 1 h bei 37°C/225 rpm inkubiert. Zur Selektion wurden sie dann auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen.

2.3.5. Alkalische Zelllyse

Um die Plasmid-DNS aus den *E.coli*-Zellen zu isolieren, wurden diese in NaOH/SDS lysiert (Birnboim & Doly 1979). Dabei werden DNS und Proteine denaturiert, zugesetzte RNase A verdaut die freigesetzte RNS. Durch Neutralisation mit Kaliumacetat kann die kleine Plasmid-DNS wieder renaturieren, die genomische Bakterien-DNS hingegen bleibt denaturiert und kann zusammen mit den Zelltrümmern, den zugesetzten Salzen und dem SDS abgetrennt werden. Für den kleinen analytischen Maßstab wurde eine sogenannte Minipräparation durchgeführt, für den größeren präparativen Ansatz eine Maxipräparation.

2.3.6. Minipräparation

Dazu wurden 7 ml LB-Medium mit 14 µl Ampicillin (50 mg/ml) versetzt und mit einem einzelnen Zellklon angeimpft. Dieser Ansatz wurde bei 37°C/225 rpm über Nacht bebrütet und am nächsten Morgen abzentrifugiert (5 min, 6000x g, 4°C). Das Zellpellet wurde auf Eis mit 250 µl MP1 resuspendiert, nach Zugabe von MP2 5 min bei RT inkubiert und anschließend nach Zugabe von 250 µl MP3 weitere 20 min auf Eis stehen gelassen. Nach Zentrifugation (15 min, 20000x g, 4°C) wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNS mit kaltem Ethanol 100% gefällt, bei 4°C abzentrifugiert und das mit kaltem Ethanol 70% gewaschene Pellet 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss wurde das getrocknete Pellet in der gewünschten Menge H₂O bei 37°C gelöst.

MP1	
Tris	6,06 g
EDTA·2H ₂ O	3,72 g
RNase A	100 mg
H ₂ O	ad 1000 ml
pH	8,0

MP2	
NaOH	8 g
SDS 10%	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

MP3	
KOAc	294,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH	5,5

2.3.7. Maxipräparation

Dazu wurden 150 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 3-7 ml einer für mindestens 6 h inkubierten ampicillinhaltigen Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C/225 rpm kultiviert. Die anschließende Maxi-Präparation wurde mit dem Maxi-Präparations-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.8. DNS-Fällung

Zur Reinigung oder Aufkonzentrierung von DNS wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde eine wässrige DNS-Lösung mit 0,1 Volumenteilen NaCl (5 M) und 2-2,5 Volumenteilen Ethanol 100% versetzt, 30 min bei -80°C stehen gelassen und anschließend bei 14000x g/4°C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit eiskaltem Ethanol 70% gewaschen, in der Vacuum-Konzentrator-Zentrifuge getrocknet und in Wasser gelöst.

Sehr kleine Mengen DNS wie zum Beispiel ein Ligationsansatz vor der Elektroporation wurden zusammen mit 5 µg tRNS durch Zugabe von 0,5 Volumenteilen Ammoniumacetat und 2 Volumenteilen Ethanol 100% gefällt, 30 min bei 14000x g/4°C zentrifugiert und das Pellet wie oben gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in 4 µl H₂O gelöst.

2.3.9. Restriktionsverdau

Um Plasmide und DNS-Stücke für eine Ligation vorzubereiten oder um Restriktionsschnittstellen in einem Plasmid zu überprüfen wurde ein Restriktionsverdau mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen durchgeführt (Roberts 1976). Die verwendeten Restriktionsenzyme und entsprechenden Puffer wurden von der Firma NEB bezogen. Bei Verdauen mit mehreren Enzymen wurde ein für alle Enzyme geeigneter Puffer verwendet. Ein Restriktionsansatz kann beispielsweise wie folgt aussehen:

Restriktionsverdau	
DNS (100-500 ng)	x µl
10x NEB Puffer	5 µl
Enzym 1	2-5 U
Enzym 2	2-5 U
BSA 10x	5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde bei der enzymspezifischen Temperatur, meist 37°C, für 1-4 h inkubiert. Beim Verdau von Vektoren zur Linearisierung wurde zusätzlich die endständige 5'-Phosphatgruppe mittels CIP (calf intestine phosphatase) abgespaltet, um eine Religation zu vermeiden. Dazu wurde zum Ansatz im Anschluss an den Restriktionsverdau 1 µl CIP gegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

2.3.10. Ligation

Für Ligationen wurde die T4 Ligase von NEB verwendet. In einem Ansatzvolumen von 20 µl wurden 50 ng Vektor-DNS mit dem 3-7fachen molaren Überschuss an Insert versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Dabei wird in einer ATP-abhängigen Ligase-katalysierten Rekombinationsreaktion eine Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxylende und einem 5'-Phosphatende von linearisiertem dephosphoryliertem Vektor und Insert gebildet.

Ligationsansatz	
Vektor-DNS (25-50 ng)	x µl
Insert-DNS (3-7x Überschuss)	y µl
10x T4 Ligase-Puffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

2.3.11. Elektrophoretische Auftrennung von DNS

2.3.11.1. Agarosegel

Das negativ geladene Ribose-Phosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren ermöglicht eine Auftrennung der DNS-Stücke im elektrischen Feld über ein Agarosegel. Dabei wandern die einzelnen DNS-Fragmente im Elektrophoresepuffer entsprechend ihrer Masse und ihrer Konformation unterschiedlich schnell Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit steigt mit abnehmender Masse. Zur Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs dienen die Farbmarker Bromphenolblau, welches auf Höhe der Nukleinsäurefragmente mit 10-100 bp läuft, und Xylencyanol, das auf Höhe von etwa 5 kb großen DNS-Fragmenten zu sehen ist. Um die aufgetrennten DNS-Stücke sichtbar zu machen, verwendet man den Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid, der sich zwischen die Basen einlagert und unter UV-Licht von 254 nm Wellenlänge die Nukleinsäuren rot leuchten lässt.

Für DNS-Fragmente >1000 bp wurden 0,7%ige Agarosegele verwendet, für Stücke von 200-1000 bp Länge 2%ige Agarosegele. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose mit 1x TBE in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, mit 0,8 µg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt und luftblasenfrei in einen Gelschlitten mit eingesetzten Gelkämmen gegossen. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde es in eine horizontale Elektrophoresekammer gelegt, mit 1x TBE überschichtet und die Kämme entfernt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit 6x Auftragepuffer gemischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Nach Auftragen des Standardmarkers, der DNS-Stücke definierter Länge enthält, um die Größe der Banden zu bestimmen, wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Im Anschluss an den Lauf wurde das Gel mit dem Geldetektor fotografiert. Bei präparativen Gelen wurde dann die gewünschte Bande mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNS mittels Elektroelution aus dem Gelstück freigesetzt.

2.3.11.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung sehr kleiner DNS-Fragmente wurde ein PAGE-Gel verwendet, welches ohne Ethidiumbromid gegossen wird. Bei dieser vertikalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proben wie beim Agarosegel mit 6x Auftragepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und in 1x TBE-Puffer zum Einlaufen bei 110 mA, dann für 30 min bei 270 mA aufgetrennt.

Im Anschluss wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (15 µl Ethidiumbromid in 200 ml H₂O für 15 min inkubiert, weitere 15 min mit bidestilliertem Wasser gespült und mit dem Geldetektor fotografiert.

10x Tris-Borat-EDTA (TBE)	
Tris-HCl	540 g
Borsäure	275 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	200 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

6 x Auftragepuffer	
Ficoll	18 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	60 ml
Bromphenolblau (50 mg/ml)	3 ml
Xylencyanol FF (50 mg/ml)	3 ml
H ₂ O	ad 100 ml

PAGE-Gel	
Rothiphoresegel (Acrylamid/ N,N'-Bisacrylamid 29:1, 40%)	3,8 ml
1x TBE	ad 30 ml
TEMED	35 µl
APS	80 µl

2.3.12. Elektroelution

Um DNS aus präparativen 0,7%igen Gelen zu eluieren, wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, das jeweilige Gelstück dann in einen Dialyseschlauch überführt und mit 300 µl 1x TBE-Puffer versetzt. Nachdem der Schlauch mit Klammern luftdicht verschlossen worden war, wurde er in eine mit 1x TBE gefüllte, eisgekühlte Elutionskammer gelegt und bei 145 mA 1,5 h eluiert. Danach wurde der TBE-Puffer im Schlauch, der nun die DNS enthielt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNS präzipitiert.

2.3.13. Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe

Aufgrund der Größe der genomischen DNS-Moleküle ist es nicht möglich, diese analog zur Vorgehensweise bei der Isolierung von Plasmid-DNS zu isolieren, da sie durch Scherkräfte leicht zerstört werden. Daher wird zur Lyse der Zellmembranen ein detergenshaltiger Puffer verwendet, um die Zellmembran zu solubilisieren. Hierfür wurde der 10x Taq-Puffer von Genescript oder der unten angegebene Lysepuffer verwendet. Im Anschluss werden die Proteine denaturiert und durch zugesetzte Proteinase K abgebaut.

Das ebenfalls im Lysepuffer enthaltene EDTA komplexiert mehrwertige Kationen und hemmt somit die DNase-Aktivität im Lyseansatz. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 55°C inkubiert und am folgenden Tag für 15 min auf 95°C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Die DNS wird anschließend zur Aufreinigung alkoholisch gefällt.

Lysepuffer	
NaCl	0,3 g
0,5 M Tris-HCl pH 7,5	10 ml
EDTA	1,86 g
N-Lauroylsarcosinat	2,5 g
H ₂ O	ad 500 ml
Autoklavieren	

Die Proteinase K wird direkt vor dem Verdau in einer finalen Konzentration von 0,25 mg/ml zugegeben.

2.3.14. Isolierung von RNS aus Mausgewebe

Grundsätzlich ist bei der Isolierung von RNS darauf zu achten, die Aktivität der vorhandenen Ribonukleasen so gering wie möglich zu halten und eine Kontamination mit RNAsen zu verhindern. Zur Inaktivierung dieser äußerst stabilen Proteine verwendet man reduzierende Agentien wie β -Mercaptoethanol oder Guanidiniumisothiocyanat. Zur Denaturierung von RNAsen wurden für die Isolierung benötigte hitzestabile Verbrauchsmaterialien über Nacht bei 250°C gebacken.

2.3.15. Isolierung von Gesamt-RNS aus Mausgewebe

Zur Isolierung aller RNS-Formen aus einem Gewebe wurde dieses nach der Präparation zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill pulverisiert. Anschließend wurde das Gewebepulver mit peqGOLD RNAPure mit einem Teflon-Potter homogenisiert, dabei wurden 2 ml der Guanidinisothiocyanat-haltigen Lösung je 100 mg Gewebe eingesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (dabei dissoziieren die Nukleotidkomplexe) wurden 0,2 ml Chloroform je eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure zugegeben und die Probe auf dem Vortex gemischt. Nach weiteren 10 min Inkubation des Ansatzes auf Eis wurde dieser 5 min bei 12000x g und 4°C zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erhalten.

Die obere, farblose wässrige Phase enthält dabei die RNS, die DNS und die Proteine finden sich in der Inter- oder der Phenolphase. Die RNS-haltige Phase wurde abgetrennt und mit Isopropanol gefällt. Nach Aufreinigung wurde die RNS in RNase-freiem DEPC-Wasser gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.16. Isolierung von mRNA aus Mausgewebe

Messenger-RNS, kurz mRNA, lässt sich mit Hilfe ihres Poly-A⁺-Schwanzes, also einer Kette von bis zu 200 aneinandergereihten Adenin-Nukleotiden am 3'-Ende der RNS, von anderen RNS-Formen abtrennen. Dies erreicht man unter Zuhilfenahme von Polythymidilsäure, die an den Poly-A⁺-Schwanz der mRNA bindet. Hier wurde das DynaBeads Biomagnetic Separation System verwendet, bei dem an der Oberfläche magnetischer Polystyrolkugeln Oligo(dT)-Ketten kovalent gebunden sind. 10-20 mg schockgefrorenes Gewebe wurden mit Mörser und Pistill pulverisiert. Das Pulver wurde in 900 µl GTC-Lösung mit einem Teflonpotter weiter homogenisiert. Dann wurden 800 µl Bindungspuffer zugesetzt, der Ansatz gemischt und bei 11800 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 50 µl gewaschenen und equilibrierten DynaBeads gegeben und für weitere 5 min im Überkopfschüttler inkubiert. Dabei bindet der Poly-A⁺-Schwanz der RNS an die DynaBeads. Mit Hilfe eines Magneten, der die DynaBeads im Reaktionsgefäß fixiert, konnte der Überstand abgenommen werden, die DynaBeads wurden 3 Mal mit je 300 µl Waschpuffer gereinigt und nach vollständiger Entfernung des Waschkuffers mit 10 µl DEPC-Wasser versetzt. Während einer 2-minütigen Inkubation bei 65°C löst sich die RNS von den DynaBeads. Der RNS-haltige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

H₂O_{DEPC}	
Diethylpyrocarbonat	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
über Nacht rühren, autoklavieren	
1x Bindungspuffer	
1 M Tris/HCl (pH 8,0)	5 ml
Lithiumchlorid	0,848 g
0,5 M EDTA	2 ml
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 ml

4 M Guanidinisothiocyanat-Lösung	
H ₂ O _{DEPC}	27,5 ml
3 M NaOAc (pH 5,4)	330 µl
Guanidinisothiocyanat	23,65 g
1 M DTT	5 µl
Lauroylsarcosinat	0,25 g
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 ml

1x Waschpuffer	
1 M Tris/HCl (pH 8,0)	500 µl
Lithiumchlorid	0,318 g
0,5 M EDTA	100 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 ml

2.3.17. Synthese von cDNS

Zum Umschreiben von Boten-RNS in komplementäre, einsträngige cDNS wurde die Superscript II Reverse Transcriptase verwendet. Als Startpunkt für das Enzym wurden Oligo(dT)-Primer (2,5 µM) verwendet, die während der 10 min Inkubation bei 70 °C aufgeschmolzen wurden und sich in einer anschließenden 5 minütigen Hybridisierungsphase auf Eis an die Poly(A)⁺-Schwänze der RNS anlagerten. In Anwesenheit von 10 mM dNTPs, 1 mM DTT und 5x First Strand Buffer bindet die Polymerase an diese doppelsträngige Region und synthetisiert cDNS. Nach 1 h Inkubation bei 42 °C wird das Enzym durch Erhitzen auf 95°C inaktiviert und die im Ansatz verbliebene RNS durch Zugabe von RNase H (10 mg/ml) verdaut. Die gewonnene cDNS wurde bei -20°C gelagert und als Template für PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.3.18. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen wässriger Nukleinsäurelösungen wurden mit dem Nanodrop Photometer bestimmt. Dabei wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, die Geräteausgabe erfolgt in ng/µl. Zusätzlich bestimmt der Nanodrop die Reinheit der Probe über das Verhältnis OD_{260/280}, ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 weist auf eine nur geringe Proteinverunreinigung hin.

2.3.19. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNS-Lösungen wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt, gut durchmischt und bei 13000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält die DNS. Sie wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und die DNS anschließend alkoholisch gefällt.

2.3.20. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren, um bestimmte DNS-Sequenzen gezielt zu amplifizieren (Mullis & Faloona 1987). Sie besteht grundsätzlich aus drei Schritten: einem 94-98°C-Schritt, bei dem die DNS durch Hitzedenaturierung in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen wird, gefolgt von einem sogenannten Annealing-Schritt, bei dem sich die spezifischen Oligonukleotid-Primer an die DNS-Einzelstränge anlagern.

Dabei werden die Primer so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNS-Stück von einem Ende her auf dem kodierenden, vom anderen Ende her am nicht-kodierenden DNS-Strang flankieren. Die Annealing-Temperatur richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der Primer, sie liegt normalerweise zwischen 45 und 60°C und ist dabei etwa 5°C niedriger zu wählen als die Schmelztemperatur des Primers. Der dritte und letzte Schritt dient der sogenannten Elongation, bei der die Polymerase ausgehend von dem kurzen doppelsträngigen Primer–DNS-Hybrid den fehlenden komplementären DNS-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Die Elongationstemperatur hängt dabei von der verwendeten Polymerase ab, meist liegt sie bei 72°C. Die Elongationszeit ist wiederum abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragments.

Diese Abfolge aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird mehrere Male wiederholt, rein rechnerisch findet dabei in jedem Zyklus eine Verdoppelung der DNS-Fragmente statt, so dass im Idealfall bei x Zyklen pro Ausgangsfragment 2^{x-1} Amplifikate entstehen.

2.3.20.1. Verwendete Polymerasen

Taq-Polymerase (Genscript)

Die thermostabile Taq-Polymerase zeichnet sich durch eine sehr hohe Syntheseleistung aus, dem gegenüber steht der Nachteil einer relativ hohen Fehlerrate (0,1% falsch eingebaute Basen). Diese Polymerase wurde daher nur für Genotypisierungen eingesetzt.

Standard-PCR-Ansatz		Standard-PCR-Programm	
DNS	10-500 ng	94°C	5 min
10x Taq-Puffer	2,5 µl	94°C	30 sec
dNTPs (1,25 mM)	4 µl	56°C	30 sec
Primer forward (10 µM)	1,25 µl	72°C	30 sec
Primer reverse (10 µM)	1,25 µl	72°C	10 min
Taq-Polymerase	0,25 µl		
H ₂ O	ad 25 µl		

} 30x

Expand High FidelityPLUS-Polymerase

Bei PCR-Reaktionen, für die eine niedrige Fehlerrate essentiell war, wurde die Expand High FidelityPLUS eingesetzt, die neben der Taq-Polymerase die ebenfalls thermostabile Pfu-Polymerase enthält. Diese Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität und korrigiert den Einbau falscher Nukleotide, auch proofreading genannt. Auf Grund der dadurch deutlich niedrigeren Fehlerrate wurde die Expand High FidelityPLUS für die Generierung von Vektoren oder für semiquantitative RT-PCRs verwendet.

Standard-PCR-Ansatz		Standard-PCR-Programm	
DNS	10-500 ng	94°C	2 min
5x High-Fidelity-Puffer	10 µl	80°C	Pause
dNTPs (1,25 mM)	8 µl	94°C	2 min
Primer forward (10 µM)	2 µl	94°C	30 sec
Primer reverse (10 µM)	2 µl	68°C	30 sec -1°C
High-Fidelity-Polymerase	0,5 µl	72°C	2 min
H ₂ O	ad 50 µl	94°C	30 sec
		45-60°C	30 sec
		72°C	2 min
		72°C	10 min

} 10x
} 25x

Bei Verwendung dieses Systems wurde außerdem ein sogenannter Hot-Start durchgeführt, bei dem die Polymerase erst nach einem initialen Denaturierungsschritt zum Ansatz gegeben wird (80°C). Dies beugt Primer-Dimerisierungen und Fehlhybridisierungen vor.

Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden PCR-Fragments, pro kb rechnet man mit 1 min Elongationszeit. Da sich bei Primern, die eine Mutation in die DNS einführen sollen, die tatsächliche Annealing-Temperatur nur schwer abschätzen lässt, wurde hier zusätzlich mit einem sogenannten Touchdown gearbeitet. Dabei wird während der ersten 10 Zyklen die Anlagerungstemperatur der Primer um jeweils 1°C reduziert, um so eine breitere Temperaturspanne abzudecken.

Phusion High Fidelity PCR Kit (Finnzymes)

Die Phusion High Fidelity Polymerase ist ebenfalls ein thermostabiles Enzym mit hoher Syntheseleistung, das sich zudem durch eine Korrekturaktivität auszeichnet. Der Einsatzbereich dieses Systems deckt sich mit dem der Expand High FidelityPLUS.

Standard-PCR-Ansatz		Standard-PCR-Programm	
DNS	10-500 ng	98°C	2 min
5x Phusion HF-Puffer	10 µl	98°C	30 sec
dNTPs (10 mM)	1 µl	65°C	30 sec -1°C
Primer forward (10 µM)	2 µl	72°C	2 min
Primer revers (10 µM)	2 µl	98°C	30 sec
Phusion-Polymerase	0,5 µl	45-60°C	30 sec
H ₂ O	ad 50 µl	72°C	2 min
		72°C	10 min

}

10x

}

25x

Wie bereits bei der Expand High FidelityPLUS beschrieben wurde auch bei diesem Programm ein Touchdown verwendet, für die Elongationszeit rechnet man hier mit 30 sec/kb.

2.3.20.2. Generierung von Oligonukleotid-Primern

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe der Software DNAMAN 5.0 ausgesucht, auf Schmelztemperatur, Purin- und Pyrimidinbasenanteil, Selbst-Annealing sowie die Ausbildung von Haarnadelstrukturen überprüft und anschließend von der Firma MWG Operon synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden dann in der von MWG angegebenen Menge H₂O gelöst, so dass sich eine Konzentration von 10 µmol/l ergab.

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur möglichst zwischen 50 und 60°C lag und der Anteil der Pyrimidinbasen bei 40-60% lag. Der Vorwärtsprimer liegt immer 5', der Rückwärtsprimer 3' des zu amplifizierenden Fragments. Wurden die Primer zur Mutagenese verwendet, so wurden die Mutationen immer am 5'-Ende des jeweiligen Primers eingeführt. Eine Auflistung aller verwendeten Primer findet sich im Anhang.

2.4. Biochemische Methoden

2.4.1. Proteingewinnung mittels SDS/Tris-Aufschluss

2.4.1.1. Proteingewinnung aus murinem Gewebe

Das Gewebe wurde der Maus entnommen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das gefrorene Gewebe auf Trockeneis in einem bei -20°C vorgekühlten Achatmörser zwischen mehreren Lagen Alufolie zermahlen. Das so entstandene Pulver wurde mit 2% SDS/50 mM Tris, pH 7,4 versetzt (100 µl/10 mg Gewebe) und 15 min bei 95°C unter gelegentlichem Vortexen gekocht. Anschließend wurde 5 min bei 20000x g zentrifugiert und der Überstand nach dem Aliquotieren bei -80 °C eingefroren.

2.4.1.2. Proteingewinnung aus HEK 293T-Zellen

Für den SDS-Aufschluss aus HEK 293T-Zellen wurden die Zellen in einer 25 mm²-Flasche mit PBS vom Flaschenboden abgespült und in einem 15 ml - Falcon gesammelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 250 µl 2% SDS/50 mM Tris, pH 7,4 resuspendiert. Für größere Kulturfラスchen wurde entsprechend mehr Puffer eingesetzt. Anschließend wurde der Ansatz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 15 min bei 95°C unter gelegentlichem Vortexen gekocht, 5 min bei 20000x g abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.4.2. Quantitative Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde das BC Assay Protein Quantification Kit verwendet. Dieser Test beruht auf einer Redox-Reaktion in Kombination mit der photometrischen Detektion eines farbigen Komplexes aus Cu⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA).

Dabei werden zunächst Cu^{2+} -Ionen von den Proteinen komplex gebunden und dabei zu Cu^+ -Ionen reduziert. Cu^+ -Ionen bilden mit BCA violette Farbkomplexe im stöchiometrischen Verhältnis 1:2. Diese Farbkomplexe wiederum zeigen eine starke Absorption bei 540 nm, die photometrisch gemessen werden kann. Über eine Standardverdünnungsreihe mit BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich von 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ konnten dann die jeweiligen Proteinkonzentrationen der Proben aus der Absorption errechnet werden.

Alle Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen ermittelt, ebenso die Werte für die Standardgerade. Da die lineare Umrechnung von Absorption auf Konzentration nur in einem bestimmten Absorptionsbereich möglich und nur innerhalb der Eichgeraden genau ist, wurden verschiedene Verdünnungen von 1:50 bis 1:1000 aus den Proben hergestellt und jeweils 50 μl dieser Verdünnungen sowie 50 μl der Standardlösungen mit 200 μl eines Gemisches aus BC Assay Reagent A und B (50:1) versetzt. Reagent A enthält dabei die Bicinchoninsäure, Reagent B die Cu^{2+} -Ionen. Die Ansätze wurden 45-60 min bei 60°C im Thermoschüttler inkubiert, jeweils 200 μl jeder Probe in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktionen bei 540 nm gegen H_2O als Blank-Wert mit dem Titertek Multiskan MCC/340 bestimmt. Mit Excel wurde im Anschluss aus den Standardextinktionen die Geradengleichung für die Eichkurve ermittelt, über diese Geradengleichung wurden dann die Konzentrationen der Proteinproben aus den Extinktionswerten errechnet.

2.4.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über SDS-Gelelektrophorese. Als anionisches Detergens bindet SDS (Natriumdodecylsulfat) an die Proteine und bildet Mizellen, in denen die Eigenladung der Proteine maskiert wird und sie demnach ausschließlich nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Durch das SDS sind die Mizellen negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 4x Lämmli-Puffer aufgekocht. Dieser Denaturierungspuffer enthält neben SDS außerdem DTT, das die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen reduziert und dadurch aufspaltet (Laemmli 1970). So wird die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufgelöst, die Proteine liegen linearisiert vor und es wird gewährleistet, dass die Auftrennung der Proteine auch nicht von der Struktur, sondern ausschließlich von der Masse abhängt. Das verwendete Gel besteht aus einem engmaschigen Trenngel und einem weitmaschigen Sammelgel.

Zur Herstellung des Gels wurden zunächst alle Komponenten des Sammelgels und des Trenngels bis auf APS und TEMED gemischt. Nach Zugabe dieser beiden Komponenten wurde das noch flüssige Trenngel bis 1,5 cm unterhalb des unteren Rands in die vorbereiteten Glasplatten (Biorad) eingefüllt, zwischen denen sich ein definierter Abstand befindet, und mit 100% Ethanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche des Gels zu gewährleisten. TEMED und APS starten als Radikalbildner die Polymerisierungsreaktion des Acrylamids.

Das Gel polymerisiert innerhalb von etwa 30 min. Nach der abgeschlossenen Polymerisierung wurde das Ethanol abgesaugt und 3 Mal mit Wasser nachgespült. Nach Entfernung aller Flüssigkeitsreste wurde das Sammelgel fertig gemischt, auf das Trenngel gegossen und sofort ein Gelkamm in das Sammelgel gesetzt. Dieser erzeugt Aussparungen, in die später die Proben gegeben werden. Nach etwa 15 min war auch das Sammelgel fest. Das Gel wurde daraufhin in die Mini-Protean Tetra System Gelkammer eingesetzt und mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt.

Die Proben wurden mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Im Anschluss wurde der Kamm aus dem Gel entfernt, die Taschen mit Puffer aufgefüllt und die Proben in die Taschen pipettiert, wo sie dank des Glycerins im Denaturierungspuffer auf den Taschenboden sinken. Als Größenstandard wurden 5 µl Precision Plus Protein Standard All Blue auf das Gel aufgetragen. Dann wurde eine Spannung von zunächst 60 V angelegt, bis die Laufront in das Trenngel übergegangen war, danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Laufzeit endete, sobald die durch Bromphenolblau markierte Laufront am Ende des Trenngels angekommen war.

10x TBS (pH 8,2)	
Tris Base	12,1 g
NaCl	87,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

1x TBST	
10 x TBS	100 ml g
Tween 20	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

4x Tris/SDS pH 8,8 (Trenngelpuffer)	
Tris Base	18,2 g
SDS	0,4 g
H ₂ O	ad 1000 ml

4x Tris/SDS pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	
Tris Base	6,04 g
SDS	0,4 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Trenngel					
	6%	7,5%	8%	10%	
29:1 Acrylamid	3,0	3,75	4,0	6,0	ml
4x Tris/SDS (pH 8,8)	3,75	3,75	3,75	3,75	ml
H ₂ O	8,25	7,50	7,25	6,25	ml
APS	50	50	50	50	μl
TEMED	10	10	10	10	μl

Sammelgel		
29:1 Acrylamid	325	μl
4x Tris/SDS (pH 6,8)	625	μl
H ₂ O	1525	μl
APS	6,25	μl
TEMED	2,5	μl

10x Elektrophoresepuffer	
Tris Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

4x Lämmli-Puffer	
1 M Tris (pH 6,7)	10 ml
20% SDS	12,5 ml
Bromphenolblau	20 mg
Glycerin	20 ml
DTT	2 mg
H ₂ O	ad 50 ml

2.4.4. Western Blot

Zur Identifizierung der aufgetrennten Proteine wurden diese zunächst mittels des Semi-Dry-Verfahrens auf eine spezielle PVDF-Membran transferiert, auf der sie mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden können (Burnette 1981, Towbin et al. 1979). Dazu wurden 10 Filterpapiere (Whatman 3MM) und die PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) in der Größe des Trenngels zugeschnitten. Drei Filterpapiere wurden mit Anodenpuffer 1 getränkt, darüber wurden zwei Filterpapiere aus Anodenpuffer 2 gestapelt und die Luftblasen mit einer Stripette ausgestrichen. Die Membran wurde kurz in Methanol eingeweicht, anschließend in Anodenpuffer 2 gespült und auf die Filterpapiere geschichtet. Das SDS-Gel wurde auf die Membran überführt, glatt gestrichen und darauf die 5 im Kathodenpuffer eingeweichten Filterpapiere gelegt.

Dieser Stapel wurde auf die Anodenplatte gelegt, mit der Kathodenplatte abgedeckt und ein Strom von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ angelegt, um die Proteine auf die Membran zu transferieren. Nach einer Stunde wurde die Membran in Blockinglösung (5% Milchpulver in 1x TBST) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am Folgetag wurde der Blot mit 1x TBST gewaschen und für 90 min bei Raumtemperatur im primären Antikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung auf dem Rotator inkubiert. Im Anschluss wurde der Blot dreimal für jeweils 10 min mit 1% Milchpulver in 1x TBST gewaschen und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper reagiert mit der sogenannten Fc-Region des primären Antikörpers. Es folgte ein weiterer Waschschrift (zweimal 10 min 1% Milchpulver in 1x TBST, zweimal 5 min in 1x TBST), bevor das zu detektierende Protein mittels Chemilumineszenz auf der Membran sichtbar gemacht wurde. Hierfür wurde das ECL Advance Western Blotting Detection Kit verwendet, das Luminol, ein Substrat der Meerrettichperoxidase, enthält. Dafür wurden je 1 ml Reagenz A und Reagenz B gemischt und der Blot darin für 1 min unter Schwenken inkubiert. Hierbei katalysiert die Meerrettichperoxidase eine Reaktion, bei der Luminol oxidiert wird und dabei eine Lumineszenz erzeugt. Diese wurde mit der CCD-Kamera des LAS4000 Mini detektiert und mit der Multi Gauge 2.0-Software ausgewertet.

2.4.5. Immuncytologische Methoden

Um die Anwesenheit und Verteilung von Proteinen in Zellen zu untersuchen, wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper auf isolierten Zellen eingesetzt und mit dem konfokalen Laserscanmikroskop detektiert. Die auf Plättchen ausgesäten Zellen wurden mit PBS gespült, um das Medium abzuspülen, und 1 h bei Raumtemperatur in Blockinglösung inkubiert. Diese besteht aus 10% Normal Goat Serum, 0,3% Triton-X und PBS. Für die anschließende Inkubation im primären Antikörper wurde dieser nach Angaben des Herstellers mit 5% NGS und 0,3% Triton-X in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen und anschließend der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper auf die Zellen aufgebracht. Dieser wurde in 5% NGS in PBS nach Herstellerangaben verdünnt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach 1 h wurde wiederum dreimal 5 min mit PBS gewaschen und die Zellplättchen mit Aquatex auf Objektträger geklebt.

Alternativ wurde bisweilen auch mit Permafluor Mounting Medium eingedeckelt, dem Hoechst (0,2 µg/ml) zugesetzt war, um gleichzeitig die Zellkerne anzufärben. Die Objektträger wurden zum Trocknen und zur kurzzeitigen Lagerung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.4.6. Histologische Methoden

Für morphologische Untersuchungen von Geweben wurden diese entnommen und zunächst mit 4% Paraformaldehyd in PBS über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Organe mit PBS gespült und über eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 95% und 100%) für jeweils 1 h bei Raumtemperatur dehydriert, darauf folgten Schritte in Ethanol/Toluol 1:1 und 100% Toluol (jeweils 1 h bei Raumtemperatur). Die Dehydrierung erfolgte auf einem Schüttler. Es folgten mindestens einstündige Inkubationsschritte in Paraplast I-III bei 60°C. Im Anschluss wurde das Gewebe in frischem Paraplast möglichst luftblasenfrei eingebettet. Nach dem Erstarren der Paraffinblöcke auf Eis wurden mit dem Microtom 8-12 µm dicke Schnitte angefertigt, diese wurden in einem 42°C warmen Wasserbad geglättet und auf polylysierte Objektträger aufgezogen. Das Trocknen erfolgte über Nacht bei 37°C im Trockenschrank. Für Färbungen und immunhistologische Untersuchungen wurden die Schnitte für mindestens 2x 20 min in 100% Toluol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe für jeweils 5 min rehydriert, bevor die Schnitte mit PBS gespült und in PBS bei 4°C aufbewahrt werden konnten.

2.4.6.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung)

Die Objektträger wurden zunächst für 10 sec in Hämatoxylinlösung getaucht, um die Zellkerne blau anzufärben. Dann wurden die Schnitte für 2x2 min mit Wasser gewaschen, kurz in 0,1%ige Ammoniaklösung getaucht und im Anschluss 10 sec in die Eosinlösung gelegt. Dabei wird das Cytoplasma rot angefärbt. Es folgten eine Dehydrierung mit der aufsteigenden Ethanolreihe für je 5 min sowie ein 5-minütiger Schritt in Xylol. Danach wurden die Objektträger mit DePex-Harz eingedeckelt.

Hämatoxylin nach Harris	
Hämatoxylin	7,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Eosin	
Eosin Y	6 g
Phloxine B	1,5 g
70% Ethanol	ad 250 ml

2.4.6.2. Trichromfärbung

Die entparaffinierten Objektträger wurden 15 min bei 56°C im Wasserbad in Bouin's Lösung gekocht, um die Färbung zu verstärken, dann in deionisiertem Wasser gewaschen und für 5 min in Weigerts Eisen-Hämatoxylin-Reagenz (1:1) inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Nach einem weiteren 5-minütigen Waschschrift wurden die Schnitte für 5 min in Biebrich Scharlachrot Säurefuchsin-Lösung inkubiert, um Cytoplasma und Muskel anzufärben. Die Objektträger wurden wiederum mit deionisiertem Wasser gewaschen und für 5 min in Phosphowolfram-Phosphomolybdänsäure-Wasser-Gemisch (1:1:2) gelegt. Dies dient zur Vorbereitung der Schnitte für die darauf folgende Anilinsäurefärbung. Mit Anilinsäure wurde dann die Kollagenfasern 5 min lang angefärbt. Zum Fixieren der einzelnen Färbungen wurden die Schnitte 2 min mit 1% Essigsäure gespült und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, den Abschluss bildete eine Inkubation in Xylol für 5 min. Dann wurden die Objektträger mit DePex eingedeckelt.

2.5. Zellbiologische Methoden

2.5.1. HEK 293T-Zellkultur

Für Transfektionsexperimente wurden HEK 293T-Zellen (Human embryonic kidney cells) verwendet. Sie wurden in Quantum 286 unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin kultiviert und bei 37°C und 5,5% CO₂ bebrütet. Sobald sie zu 100% konfluent gewachsen waren, wurden sie passagiert. Dabei wurden sie zunächst mit Trypsin/EDTA in PBS anverdaut, so dass sie sich leichter mit Medium vom Boden der Zellkulturflasche abspülen ließen, wobei das Medium auch den Verdau der Zellen abstoppt. Die Zellen wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vereinzelt, die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die gewünschte Menge an Zellen wieder in der Flasche ausgesät. Dann wurde der Flaschengröße entsprechend neues Quantum 286-Medium zugegeben und mit Penicillin/Streptomycin versetzt. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.5.2. Transfektion von HEK 293T-Zellen

Zur Transfektion der HEK 293T-Zellen wurde Lipofektamin 2000 verwendet (Lee et al. 2006). Lipofektamin enthält das polykationische Lipid DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanamintrifluoro-acetat) und dem neutralen Lipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) im Verhältnis 3:1. Die negativ geladene DNS bindet an das kationische Lipid und wird in Liposomen eingeschlossen, die über ihre hydrophoben Anteile mit der Zellmembran der HEK-Zellen fusionieren können. Für die Transfektion von HEK 293T-Zellen auf Plättchen wurden Glasplättchen mit Poly-L-Lysin (10 µl auf 5 ml ddH₂O) für 1 h beschichtet, anschließend mit PBS gewaschen, in einer 24-Well-Platte 20000 Zellen je Plättchen ausgesät und mit Quantum 286-Medium zu 1 ml ergänzt. Nach 24 h wurden 0,15 µg DNS je Vektor mit 50 µl OptiMEM-Medium (GIBCO) gemischt und für 5 min inkubiert. Parallel dazu wurden 0,5 µl Lipofektamin 2000 mit ebenfalls 50 µl OptiMEM gemischt und 5 min inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die beiden Ansätze gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Quantum-Medium wurde von den Zellen abgesaugt, sie wurden mit warmen PBS gewaschen, 500 µl OptiMEM zu jedem Well gegeben und schließlich 100 µl des DNS-Lipofektamin-Ansatzes auf die Plättchen pipettiert. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C und 6% CO₂ bebrütet, bevor sie fixiert und für eine Immuncytochemie verwendet wurden.

Für die Transfektion in Flaschen wurden die Zellen in Quantum 286-Medium kultiviert, bis sie zu etwa 80% konfluent gewachsen waren. Für eine 75 mm²-Flasche wurden 10 µg DNS je Vektor sowie 33,3 µl Lipofektamin in jeweils 3,3 ml OptiMEM eingesetzt. Die Durchführung der Transfektion erfolgte analog zu der auf den Plättchen, die Flasche wurde mit OptiMEM auf 20 ml Endvolumen ergänzt. Für einen Western Blot wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mit PBS geerntet.

2.5.3. Primärkultur embryonaler Cardiomyocyten

Zur Präparation embryonaler Cardiomyocyten (Seisenberger et al. 2000) wurden die Elterntiere am Abend verpaart, am nächsten Morgen wurde ein Plug-Check durchgeführt und die Plug-positiven Weibchen separiert. Für die Schwangerschaft wurde dieser Morgen als Zeitpunkt "Tag 0,5" angenommen. Zum gewünschten Zeitpunkt der Schwangerschaft wurde die Mutter euthanasiert, das Peritoneum geöffnet und der Uterus entnommen.

In auf 37°C vorgewärmten ADS-Puffer wurden die Embryonen aus dem Uterus freigelegt. Die Eihaut wurde aufgeschnitten und der Embryo herausgenommen. Anschließend wurden die Embryonen durch Dekapitation ebenfalls euthanasiert, der Brustraum geöffnet, das Herz entnommen und in ADS-Puffer überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Atrien von den Ventrikeln getrennt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die mit 0,5 ml ADS-Puffer gefüllt waren. Ein Stück Gewebe des Embryos wurde zur Genotypisierung aufbewahrt. Die Atrien und Ventrikel wurden anschließend im Schüttler bei 37°C in 0,5 ml einer Enzymlösung aus 0,25 mg Liberase DH pro ml ADS-Puffer für 15 min verdaut. Danach wurden sofort 0,5 ml DMEM-Medium mit 5% FCS und Penicillin/Streptomycin zu jedem Verdau gegeben, um diesen abzustoppen. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die Atrien und Ventrikel vorsichtig resuspendiert und für einige Minuten stehen gelassen, um den unverdauten Anteil zum Gefäßboden absinken zu lassen. Vom Überstand wurden je 300 µl in eine 24-Well-Platte auf Plastikcoverslips pipettiert und mit DMEM mit 5% FCS und Penicillin/Streptomycin auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden für mindestens 24 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

ADS-Puffer	
NaCl	116 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	0,8 mM
HEPES	20 mM
Glucose	5,5 mM
pH 7,35, autoklavieren	

2.5.4. Primärkultur adulter Cardiomyocyten

Für die Isolierung adulter Cardiomyocyten nach Protokoll AfCS Procedure Protocol PP00000125 wurde die Maus zunächst heparinisiert. Dazu wurden 100 µl Heparin mit 400 µl 0,9% NaCl gemischt und der Maus 250 µl in den Bauchraum injiziert. Nach 10 min wurde die Maus über eine weitere Injektion in den Bauchraum narkotisiert, der Thorax geöffnet und nach Entfernen des Thymusgewebes die Aorta knapp unter dem Aortenbogen durchtrennt, ebenso wurden die Pulmonargefäße durchschnitten.

Das Herz wurde in eine Petrischale mit auf 37°C vorgewärmtem PBS überführt und von Fett- und Fremdgeweberesten gesäubert. Anschließend wurde die Aorta über die Perfusionskanüle gestülpt, so dass die Spitze der Kanüle gerade über der Aortenklappe lag. Die Aorta wurde mit 6-0er Seide an der Kanüle festgebunden und der Knoten mit einer Klammer fixiert. Die Kanüle wurde auf einen bei 37°C beheizten Rückflusskühler gesteckt, der zuvor mit PBS gespült und dann mit Perfusionspuffer gefüllt worden war, und das Herz 4 min mit einer Durchflussrate von 3 ml/min perfundiert. Dann wurde weitere 10 min mit dem Verdaupuffer, für den Collagenase Typ II (Worthington) verwendet wurde, perfundiert, die Flussrate blieb bei 3 ml/min. Nach dieser Verdaupufferzeit war das Herz aufgebläht und entfärbt. Mit einer Schere wurden die unteren zwei Drittel abgeschnitten und in eine Petrischale mit Verdaupuffer ohne Collagenase und Protease gelegt. Mit feinen Pinzetten wurde das Herz in kleine Stückchen zerteilt, der Verdaupufferprozess mit Stop1-Puffer beendet und das Herz anschließend mit einer Stripette vorsichtig resuspendiert. Die Myocyten wurden abzentrifugiert und nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet in Stop2-Puffer resuspendiert. Stufenweise wurde die Calciumkonzentration auf final 1 mM erhöht, die Zellen wiederum abzentrifugiert und das Pellet in Plattiermedium resuspendiert, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf 20000 Zellen je 500 µl mit Plattiermedium verdünnt. Ausgesät wurden die Zellen auf beschichteten Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser, die zuvor 2 h lang mit 10 µg/ml Laminin in PBS inkubiert und später mit PBS gewaschen worden waren. Jeweils 500 µl Zellsuspension und 500 µl Plattiermedium wurden auf jedes Plättchen gegeben und für 1 h bei 37°C und 2% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und durch Kulturmedium ersetzt. Die weitere Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37°C und 2% CO₂.

Perfusionspuffer	
NaCl	113 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄	0,6 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 mM
Phenolrot	0,032 mM
NaHCO ₃	12 mM
KHCO ₃	10 mM
HEPES	10 mM
Taurin	30 mM
2,3-Butandionmonoxim	10 mM
Glucose	5,5 mM

Verdaupuffer	
Perfusionspuffer	1x
Collagenase	1 mg/ml
Protease	0,06 mg/ml
Trypsin	0,14 mg/ml
CaCl ₂	12,5 µM

Stop1 - Puffer	
Perfusionspuffer	1x
BCS	10%
CaCl ₂	12,5 µM

Stop2 - Puffer	
Perfusionspuffer	1x
BCS	5%
CaCl ₂	12,5 µM

Plattiermedium	
MEM	0,9x
BCS	5%
BDM	10 mM
Penicillin	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM

Kulturmedium	
MEM	1x
BSA	0,1 mg/ml
Penicillin	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM

2.6. Elektrophysiologie

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden von Herrn Jie Ding durchgeführt. Ströme wurden im Whole cell-Modus in der Patch-Clamp-Methode durchgeführt, bei dem das Membranpotential von der gesamten Zellmembran abgeleitet wird (Clapham 2007, Hamill et al. 1981). Gemessen wurde an transfizierten HEK 293T-Zellen 24-72 h nach der Transfektion und an 24-72 h zuvor isolierten embryonalen Cardiomyocyten, als Ladungsträger diente dabei Barium (I_{Ba}). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in einer mit Badlösung gefüllten Messkammer durchgeführt. Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren hergestellt und hatten einen Messwiderstand von 1,5-2 MΩ.

Sie waren mit Intrazellulärlösung gefüllt und an einen Verstärker (AxoClamp-2A, Axon) angeschlossen. Die Datenerfassung erfolgte anschließend mit der pClamp 9.0 Software (Molecular Devices). Die Signale wurden bei 5 kHz digitalisiert und bei 1 kHz gefiltert.

Zur Messung wurde die Patchpipette an die Zelloberfläche gebracht und die unter der Pipettenöffnung befindliche Membran vorsichtig in die Pipette eingesaugt, wodurch ein sogenannter GΩ-Seal erzeugt wurde. Durch eine kurzzeitige Erhöhung des Sogs wurde die Zelle geöffnet, so dass ein direkter Kontakt zwischen der Pipette und dem Intrazellulärraum entstand. So konnte die an der Zellmembran herrschende Spannung kontrolliert und der durch die Kanäle fließende Strom aufgezeichnet werden. Um die Strom-Spannungsbeziehungen zu messen, wurden die Zellen zunächst mit Depolarisierungspulsen (300 ms, 0,2Hz) von -40 bis +50 mV in Intervallen von 10 mV stimuliert. Das Haltepotential betrug -80 mV. Um Natriumkanäle zu inaktivieren wurde ein 25 ms langer Vorpuls von -80 auf -40 mV appliziert. Ströme wurden als Differenz zwischen dem größten Einwärtsstrom und dem Haltepotential von -80 mV bestimmt.

Intrazellulärlösung Cardiomyocyten	
CsCl	60 mM
Asparaginsäure	50 mM
CsOH	68 mM
MgCl ₂	1 mM
K-ATP	5 mM
CaCl ₂	1 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM

Intrazellulärlösung HEK 293T-Zellen	
CsCl	102 mM
TEA-Cl	10 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	1 mM
ATP	3 mM
HEPES	5 mM

Badlösung	
NaCl	82 mM
TEA-Cl	20 mM
BaCl ₂	30 mM
CsOH	5 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	0,1 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM

Der pH-Wert wurde jeweils mit CsOH auf 7,4 eingestellt.

2.7. *In vivo*-Untersuchungen

2.7.1. Versuchstierhaltung

Alle Versuche wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Die Tiere wurden unter einem 12:12 h Hell-/Dunkelzyklus gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Die Nachkommen aus Verpaarungen wurden 7-10 Tage nach Geburt genotypisiert, indem eine PCR-Analyse auf Schwanzgewebe durchgeführt wurde. Im Alter von 4 Wochen wurden die Jungtiere von den Müttern getrennt.

2.7.2. Konstruktion der Asp1904 Stop-Mauslinie

Die Konstruktion der Asp1904 Stop-Mauslinie wurde von Frau Toni Lemke durchgeführt. Zur Herstellung des Targeting-Vektors wurde ein 7,4 kb großes Fragment des CACNA1C-Gens aus genomischer 129/SV Maus-DNS isoliert, das die Exone 44-47 umfasst. Der Targeting-Vektor besteht aus einem kurzen Arm mit 1,2 kb und einem 6,2 kb langen Arm, der das PGK-neo- und das Thymidinkinase-Gen (tk), flankiert von zwei loxP-Stellen, beinhaltet (Abbildung 3). Der kurze 5'-Arm beinhaltet Exon 44, in das mittels Overlap-PCR Mutagenese drei Stop-Codons (TGA TAA TAG) nach dem für Aspartat1904 codierenden Basentriplett eingeführt wurden. Dieses Targeting-Konstrukt wurde in R1 ES-Zellen aus agouti-farbenen Mäusen (Nagy et al. 1993) elektroporiert. Mit G418-haltigem Selektionsmedium wurden ES-Zellklone isoliert, die den Targeting-Vektor und damit das Neomycinresistenzgen tragen. Positive Klone, bei denen eine homologe Rekombination des Targeting-Vektors mit der genomischen DNS stattgefunden hatte, wurden durch PCR-Analyse identifiziert und durch eine Southern-Blot-Analyse bestätigt, bei der eine an den 5'-Arm bindende Sonde verwendet wurde. Die ES-Zell-DNS wurde mit PstI verdaut, so dass bei erfolgter homologer Kombination ein 1,5 kb großes Stück mit der Sonde detektiert werden konnte, bei Wildtyp-DNS ist dieses Stück 2,5 kb groß. Zwei positiv getestete Klone wurden mit einem Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert, um die neo/tk-Markergene zu eliminieren. Nach einem zweiten PCR-Screening wurden drei verschiedene Klone, bei denen die Entfernung der neo/tk-Kassette erfolgreich war, in C57BL/6 Blastozysten injiziert und diese in CD1-Ammenmütter reimplantiert. Die chimären Nachkommen dieser Weibchen wurden mit C57BL/6-Tieren verpaart.

Aus diesen Verpaarungen hervorgegangene Tiere, die heterozygot für das Asp1904 Stop-Allel waren, wurden weiter verpaart. Für alle Versuche wurden Mäuse verwendet, die einen genetischen Hybridhintergrund aus 129/Sv und C57BL/6 aufwiesen.

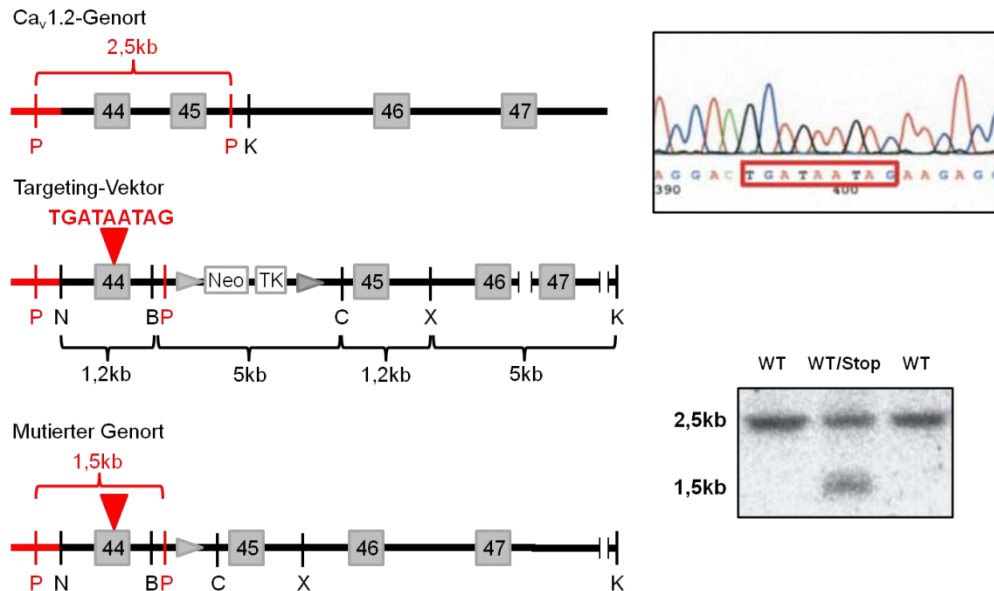


Abbildung 3 Linke Seite: Wildtypgenort von Ca_v1.2 mit den Exonen 44-47 (oben), Targeting-Vektor mit mutiertem Exon 44 und gefloxter Selektionskassette (Mitte) und mutierter Genort nach Cre-vermittelter und homologer Rekombination (unten). Rechte Seite: Sequenzanalyse des mutierten Exons 44 mit den drei Stopcodons nach dem für Asp¹⁹⁰⁴ codierenden Basentriplett GAC (oben) und Southern-Blot für zwei negative (WT) und einen positiven (WT/Stop) Klon. Graue Dreiecke: loxP-Sequenzen; P: PstI; K: KpnI; N: NotI; B: BamHI; C: ClaI; X: XhoI.

2.7.3. Herzechokardiographie

Zur Untersuchung der Kontraktilität des Herzes wurden Echokardiogramme an anästhesierten Mäusen aufgenommen und das Fractional shortening ermittelt. Das Fractional shortening dient als Maß für die Kontraktionskraft des Herzes und errechnet sich aus der Verkürzung des linken Ventrikels während des Pumpvorgangs. Die Formel lautet wie folgt:

$$\frac{LVD_{enddiastolisch} - LVD_{endsystolisch}}{LVD_{enddiastolisch}} = FS$$

LVD: Linksventrikulärer Durchmesser

Die Ultraschallmessungen wurden mit dem Vevo 770 Ultraschallgerät von Visual Sonics durchgeführt, der verwendete Ultraschallkopf RMV707B umfasst einen Frequenzbereich von 15-45 MHz.

Die verwendete Vevo-Software ermöglicht Messungen im B- sowie im M-Mode, wobei der B-Mode dazu diente, ein Übersichtsbild des linken Ventrikels einzustellen. Dann wurde in den M-Mode umgeschaltet, bei dem Bewegungen von Geweben entlang einer einzelnen Ultraschallwelle aufgezeichnet werden, in diesem Fall die Bewegung des linken Ventrikels.

Für die Messung wurden die Mäuse zunächst durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran anästhesiert. Dazu wurde die Maus über eine Maske mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch im Verhältnis 96%/4% initial und 98,5%/1,5% zur Narkoseerhaltung beatmet.

Die Maus wurde auf der mit 37°C beheizten Transmitterplatte in Rückenlage gebracht, die Brust wurde rasiert und mit Ultraschallgel bestrichen. Dann wurde ein möglichst luftblasenfreier Kontakt zwischen dem Ultraschallgel und der gesamten Membran des Ultraschallkopfes hergestellt. Über Drehen und Kippen der Transmitterplatte wurde im B-Mode eine Ebene eingestellt, die den linken Ventrikel im Kurzachsenschnitt zwischen den Papillarmuskeln zeigt.

Anschließend wurden im M-Mode der endsystolische und der enddiastolische Ventrikeldurchmesser über mehrere Herzschläge hinweg ausgemessen und gemittelt. Die Software berechnete daraus dann das Fractional shortening.

2.7.4. Elektrokardiogramm

Die EKG-Messungen wurden mit speziellen EKG-Transmittern für Kleintiere (TA10EA-F20) durchgeführt, die der Maus in den Intrapertitonealraum implantiert wurden. Diese Transmitter ermöglichen die kontinuierliche und berührungsfreie Übertragung der Herzfrequenz, der Aktivität der Maus sowie des Elektrokardiogramms auf eine Empfängerplatte (RLA 1020), ohne die Maus durch externe Drähte oder andere Umwelteinflüsse zu sehr in ihrem natürlichen Verhalten zu beeinflussen und unter Stress zu setzen. Der Transmitter besteht dabei aus zwei Elektroden, einem Sender und einem Magnetschalter mit Batterie, so dass der Transmitter von außen an- und abgeschaltet werden kann. Die Elektronik ist in ein Epoxydharz eingegossen und mit Silikon ummantelt. Nachteil dieser Methode ist der operative Eingriff, der der Messung vorausgehen muss, und die Tatsache, dass ein Fremdkörper in die Maus eingebracht wird. Daher sind die verwendeten Transmitter sehr leicht gebaut und mit 3,9 g und einer Größe von 17x12x7 mm für Mäuse ab einem Körpergewicht von 25 g geeignet.

Die Silikonummantelung sorgt für eine gute Verträglichkeit des Transmitters. Die beiden Platinelektroden sind ebenfalls mit Silikon isoliert und werden subkutan auf einer Seite zum Herz und auf der anderen Seite zur Achselhöhle geführt. Der Transmitter zeichnet die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden auf und wandelt diese in ein digitales Signal um, das mit einer Sendefrequenz von 550 kHz auf die Empfängerplatte übertragen wird, auf der der Käfig der Maus platziert wird. Der Empfänger ist an einen analogen EKG-Adapter (Option RO8) angeschlossen, welcher wiederum mit einem Analog-Digitalwandler (MacLab 4 s) verbunden ist, der das Signal auf einer Frequenz von 4 kHz digitalisiert und an den Computer über einen SCSI-Bus übertragen wird. Dort werden sie mit einer speziellen Auswertesoftware (MacLab Chart Vers. 3.6/s- 5.0) aufgenommen, abgespeichert und bearbeitet.

2.7.4.1. Einsetzen des EKG-Transmitters

Vor der Operation wurden die Elektroden des Transmitters auf die richtige Länge gekürzt, so dass eine Elektrode genau auf dem Herz lag und die andere bis zur rechten Achselhöhle der Maus reichte. Auf die Enden der Elektroden wurden Silikonkappen geschraubt. Der Transmitter wurde vor der OP mit 2% Glutaraldehyd über Nacht sterilisiert und anschließend mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Anästhesiert wurde die Maus inhalativ über eine Isoflurannarkose, die mit 4% Isofluran/96% Sauerstoff eingeleitet und mit 1,5% Isofluran/98,5% Sauerstoff erhalten wurde. Der Sauerstofffluss lag bei 2,5 l/min, beatmet wurde über eine Maske. Die Maus wurde auf den Rücken gelegt und die Körpertemperatur über eine wassergefüllte Wärmematte bei 37°C gehalten. Die Augen der Maus wurden mit Bepanthen Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Der Bauchbereich der Maus wurde mit dem Skalpell rasiert und anschließend durch einen Schnitt in Bauchdecke und Abdominalmuskelschicht geöffnet. Der Schnitt wurde gerade so lang gesetzt, dass der Transmitter eingeführt werden konnte. Der Operationsbereich wurde mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung feucht gehalten. Der Transmitter wurde durch die Öffnung in den Abdominalraum eingeführt, in die Abdominalmuskelschicht mit einer 20 Gauge-Kanüle zwei Löcher für die Elektroden gestochen und diese durchgesteckt. Mit einer Sonde wurden subkutane Trakte für die Elektroden präpariert, die zum Herz sowie zur rechten Achsel führten, und die Elektroden mit Hilfe der Sonde entlang der Trakte zwischen Bauchdecke und Abdominalmuskelschicht geführt.

Die Abdominalmuskelschicht wurde mit 6-0er Polypropylenfaden (Maprolen) vernäht. Die Elektroden wurden an der Abdominalmuskelschicht festgenäht, anschließend wurde auch die Bauchdecke wieder zugenäht. Die Maus wurde wieder aus der Narkose erweckt, in einen sauberen Käfig gesetzt und postoperativ unter einer Infrarotlampe warm gehalten. Bei Bedarf wurde den Mäusen über das Trinkwasser Ibuprofen (Nurofen Saft für Kinder) in einer Konzentration von 40 mg/100 ml gegeben. Die Messungen wurden nach einer postoperativen Erholungsphase von zwei bis drei Wochen durchgeführt.

2.7.4.2. EKG-Aufzeichnungen

Die Aufzeichnung des EKGs bei adulten Mäusen erfolgte etwa drei Wochen nach der Operation. Der Käfig der Maus wurde auf die Empfängerplatte gestellt und der Transmitter mit Hilfe eines Magneten eingeschaltet. Zunächst wurden die Basalwerte bestimmt, bevor mit den Tamoxifen-Injektionen begonnen wurde. Die Messung erfolgte im Intervall-Mode, was bedeutet, dass pro Minute jeweils ein Zeitraum von 20 sec aufgezeichnet wurde. Das Signal wurde mit MacLab Chart Version 3.6/s-5.0 abgespeichert.

Für die EKG-Messung an Neugeborenen wurde die Maus auf die Empfängerplatte gelegt, der Brustraum mit Elektrodencreme bestrichen und der Transmitter extern angelegt, mit einer Elektrode auf dem Herz und der zweiten am rechten Vorderbein. Um Störsignale zu minimieren wurde der Transmitter zusätzlich mit Durapore festgeklebt, welches sich nach der Aufzeichnung leicht wieder ablösen lässt. Die Messung erfolgte in diesem Fall kontinuierlich über mehrere Minuten hinweg. Die neugeborene Maus wurde dabei mit einer Infrarotlampe gewärmt.

2.7.4.3. EKG-Auswertung

Zur Auswertung des EKGs wurden die R-R-Abstände, also die Abstände zwischen zwei benachbarten Spitzen des EKGs gemessen. Diese wurden über einen Zeitraum von mindestens 5 min bestimmt und im Anschluss die Varianz dieser Abstände errechnet. Diese Varianz ist ein Maß für die Regelmäßigkeit des Herzschlags, eine große Varianz deutet auf Arrhythmien hin. Neben der R-R-Varianz wurde aus dem EKG auch die Herzfrequenz bestimmt.

2.7.5. Tamoxifen-Injektionen

Zur Induktion der Cre-Rekombinase bei MerCreMer-Verkreuzungen wurde den Mäusen an 4 aufeinander folgenden Tagen Tamoxifen in einer Konzentration von 2 mg/30 g Maus/Tag über peritoneale Injektionen appliziert. Dazu wurde das Tamoxifen in Mygliol im Ultraschallbad in einer Konzentration von 2 mg/100 µl gelöst, die Lösung wurde bei -20°C eingefroren. Die Injektionen erfolgten im Abstand von jeweils 24 h mit einer 27 Gauge-Kanüle.

2.7.6. Messung der Herzmuskelkontraktionskraft

Zur Bestimmung der Kontraktionskraft der Herzen neugeborener Mäuse wurde das Herz entnommen und sofort in eine Carbogen-begaste CO₂-Tyrode überführt. Durch die Herzspitze und den Ventrikelbereich zwischen den Vorhöfen wurden mit Perma-Hand-Seide 6-0 zwei Schlaufen gebunden, über die das Herz in das Organbad eines Muskelstreifenmyographen eingespannt werden konnte. Die Organbäder waren ebenfalls mit CO₂-Tyrode gefüllt und mit Carbogen begast. Das Herz wurde straff gespannt, so dass die Kontraktionen möglichst störungsarm von den Kraftabnehmern an den Computer übermittelt wurden. Das Signal wurde mit der Chart 5.0-Software aufgezeichnet und abgespeichert.

CO₂-Tyrode	
NaCl	137 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM
NaHCO ₃	12 mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,42 mM
D-(+)-Glucose	5,6 mM

2.7.7. Färbung des Ductus botalli

Der Ductus botalli stellt im fetalen Blutkreislauf die Verbindung zwischen der Aorta und dem Truncus pulmonalis, also zwischen Körper- und Lungenkreislauf dar und dient dazu, das Blut direkt von der Lungenschlagader in die Aorta zu pumpen. Ab dem Zeitpunkt der Geburt ist die Lunge ventiliert, eine stärkere Durchblutung als in der Fetalphase ist daher erforderlich. Der erste Atemzug der Maus initiiert deshalb den Verschluss des Ductus arteriosus botalli durch Vasokonstriktion, der Ductus wird dabei zum Ligamentum arteriosum, das als Bindegewebsstrang den Truncus pulmonalis mit der Aorta verbindet. Diese Vasokonstriktion wird ausgelöst durch die Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, der postnatal ansteigt (Schneider & Moore 2006). Bei der Maus dauert dieser Prozess 1-3 Stunden. Das Anfärben des Ductus botalli zeigt zum Einen, ob er zum Zeitpunkt der Geburt noch geöffnet ist, zum Anderen, ob er sich postnatal verschließt.

Dazu wurde bei einer an Tag 18,5 p.c. schwangeren Maus ein Kaiserschnitt durchgeführt und die Föten aus dem Uterus freigelegt. Die Neugeborenen wurden mit einer Infrarotlampe gewärmt und nacheinander über eine Injektionsnarkose i.p. betäubt. Dann wurden sie mit Durapore auf dem Rücken fixiert, der Brustraum geöffnet und das Herz freipräpariert. Von der Herzspitze aus wurde Evans Blue Dye in den linken Ventrikel injiziert und die Verteilung des Farbstoffs in Aorta, Truncus pulmonaris und den dazwischenliegenden Ductus botalli beobachtet und unter dem Mikroskop fotografiert (Echtler et al. 2010). Um einen besseren Blickwinkel auf Herz und Gefäße zu haben, wurde der Brustkorb mit einer abgekühlten 1%igen Agaroselösung überschichtet, so dass nach Verfestigung des Gels die Gefäße für die Kamera gut sichtbar waren. Im Anschluss wurde die Maus genotypisiert.

2.8. Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit der OriginPro 6.1 Software (OriginLab) unter Verwendung des Student t-Test durchgeführt. Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwerts) angegeben. Signifikanzniveaus sind angegeben als * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$).

3. Ergebnisse

3.1. Expression von Ca_v1.2 Mutanten in HEK 293T-Zellen

Um die Auswirkungen der Trunkierung des Ca_v1.2 C-Terminus zu untersuchen, wurden HEK 293T-Zellen mit verschiedenen Isoformen und Mutanten der α_{1c} -Untereinheit transfiziert, dabei wurde jeweils mit den akzessorischen Untereinheiten β_2 und $\alpha_{2\delta}$ co-transfiziert. Die Expression des Kanals wurde dann mittels Immunocytochemie und Western Blot untersucht.

3.1.1. Herstellung der α_{1c} Mutanten

Als Ausgangsvektoren wurden die Plasmide pcDNA3HK1 und pcDNA3LK1 (Welling et al. 1997) eingesetzt. Um die Auswirkungen einer Trunkierung des C-Terminus zu untersuchen, wurde hinter das für Serin 1905 codierende Basentriplett das Stopcodon ATG eingeführt. Dazu wurde das QuickExchange Kit verwendet. Diese Konstrukte wurden von Herrn Markus Hardt (HK1Stop) und Frau Julia Brandmayr (LK1Stop) kloniert und zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung des Konstrukts LK4Stop wurde der von Welling et al. 1997 veröffentlichte Chimärvektor LK4 verwendet, der an Position 1733 trunkiert und ebenfalls im pcDNA3 Vektor integriert ist. Mit den Restriktionsenzymen EcoRV HF und XbaI wurden dieser Vektor sowie der LK1Stop-Vektor verdaut. Dadurch wurde ein etwa 2600 bp großes Fragment aus dem LK1Stop-Plasmid geschnitten, das die Stop-Mutation beinhaltet (siehe Abbildung 4). Das diesem Fragment entsprechende Stück wurde durch den Restriktionsverdau aus dem LK4-Vektor entfernt und mittels Ligation durch das aus dem LK1Stop ausgeschnittene Stück ersetzt. Das Ligationsprodukt wurde durch chemische Transformation in XL10 Gold Zellen eingebracht, vermehrt und das neue Plasmid anschließend über eine Maxi-Präparation aus den Bakterien isoliert. Zum Nachweis der Mutation wurden ein Testverdau mit XbaI und EcoRV und eine Sequenzierung durchgeführt. Die Untereinheiten β_2 und $\alpha_{2\delta}$ lagen bereits im pcDNA3 Vektor vor.

Ergebnisse

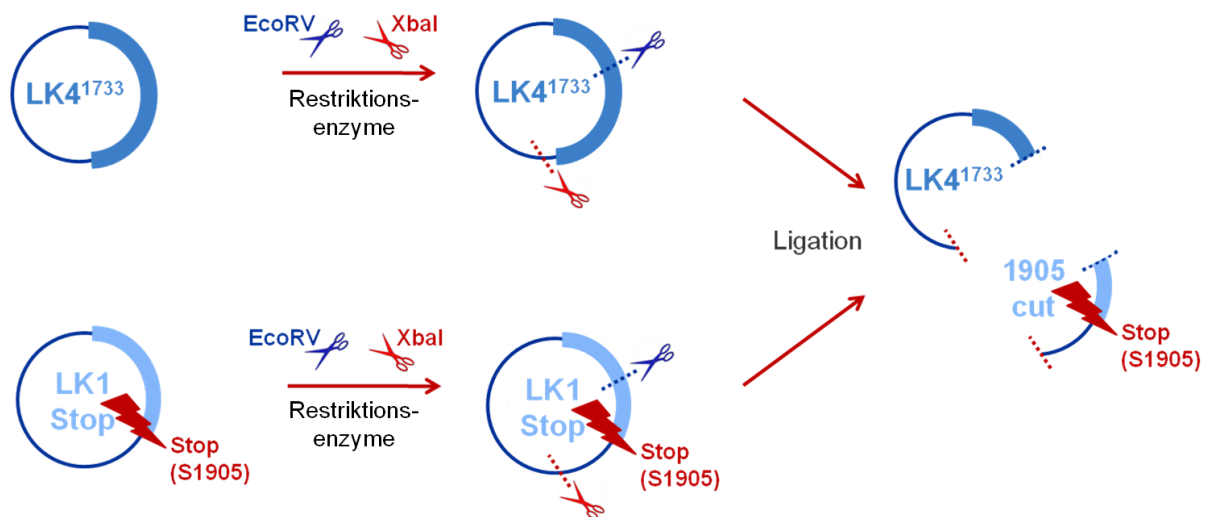


Abbildung 4 Konstruktionsschema für LK4Stop. Der Vektor wurde unter Verwendung der beiden Restriktionsenzyme EcoRV und XbaI aus den beiden Ausgangskonstruktion LK4¹⁷³³ und LK1Stop kloniert.

3.1.2. Immunocytochemische Expressionsuntersuchungen

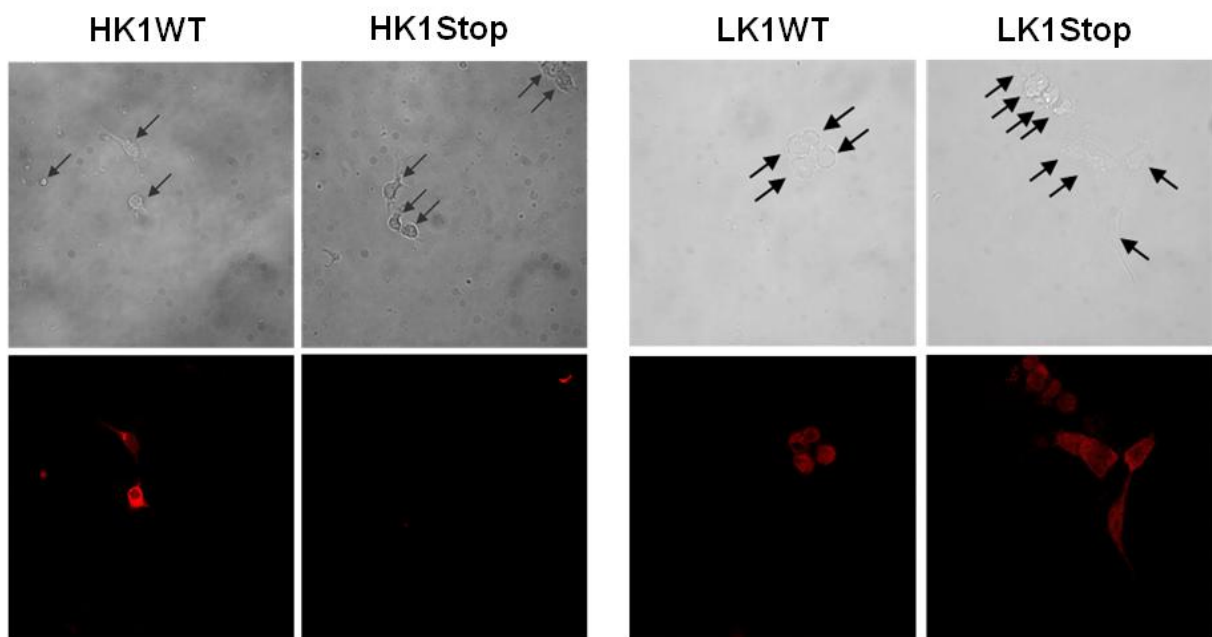


Abbildung 5 Untere Reihe: Konfokale Aufnahmen von Ca_v1.2-exprimierenden HEK 293T-Zellen nach Transfektion mit HK1 und HK1Stop (links) sowie LK1 und LK1Stop (rechts). Das Cy³-Signal zeigt jeweils die Expression des Kanalproteins an. Zum Vergleich sind Durchlichtbilder der Zellen gezeigt (obere Reihe), die Pfeile zeigen die HEK 293T-Zellen an (Vergrößerung 63x).

Die Konstrukte HK1 und HK1Stop sowie LK1 und LK1Stop wurden zusammen mit den akzessorischen Untereinheiten β_2 und $\alpha_2\delta$ in HEK 293T-Zellen exprimiert, mit 4% PFA in PBS fixiert und Ca_v1.2 mittels spezifischem Antikörper und Cy³-Labelling sichtbar gemacht.

Ergebnisse

Unter dem konfokalen Mikroskop wurden Zellen zunächst im Durchlicht gescannt und dann die Zahl der $\text{Ca}_v1.2$ exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenzsignal ermittelt. Als Nullkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit den beiden akzessorischen Untereinheiten transfiziert wurden.

Während im Falle von HK1 $53,4 \pm 1,29\%$ der Zellen ein Signal zeigten, waren nur $5,1 \pm 0,51\%$ der HK1Stop – transfizierten Zellen und damit hochsignifikant weniger $\text{Ca}_v1.2$ - positiv. Dagegen zeigten bei den mit LK1 transfizierten Zellen $95,2 \pm 2,8\%$, bei den mit LK1Stop transfizierten Zellen $89,9 \pm 2,6\%$ aller gescannten Zellen ein $\text{Ca}_v1.2$ positives Signal (siehe Abbildung 6).

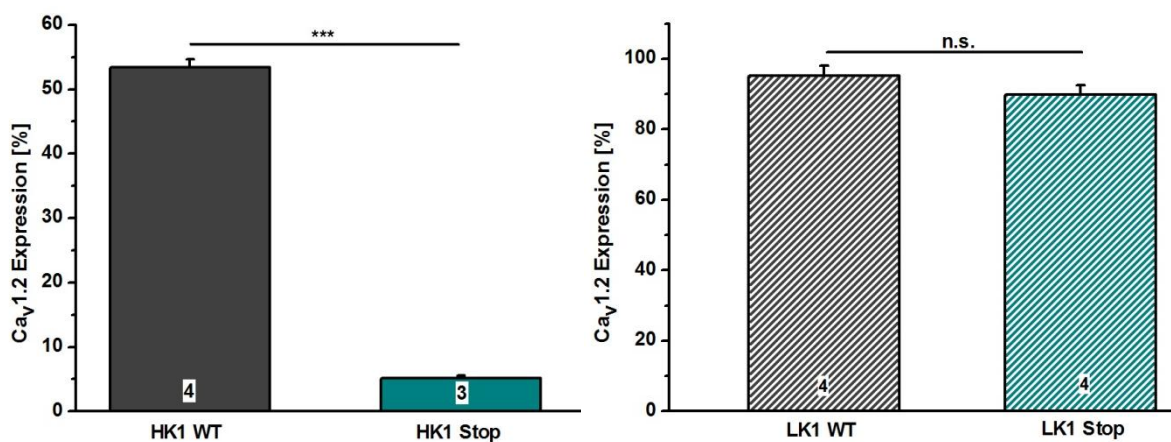


Abbildung 6 Prozentualer Anteil der Zellen mit $\text{Ca}_v1.2$ -positivem Signal, links: HK1 und HK1Stop; rechts: LK1 und LK1Stop.

3.1.3. Proteinexpression in HEK 293T-Zellen

Für die Untersuchung der Calciumkanalexpression in den transfizierten HEK 293T-Zellen wurde ebenfalls mit den akzessorischen Untereinheiten co-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Abspülen mit PBS geerntet, die Zellen pelletiert und Proteine mittels Aufkochen in 2% SDS/50 mM Tris isoliert. Auf das Gel wurden jeweils 20 μg Gesamtprotein aufgetragen. Im Western Blot mit einem 8%igen Acrylamidgel zeigten mit HK1Stop transfizierte Zellen nur ein sehr schwaches Signal, im Vergleich zu den mit HK1 transfizierten Zellen lag die Proteinexpression für $\text{Ca}_v1.2$ nur bei $5,14 \pm 1,08\%$. Bei den mit LK1Stop transfizierten Zellen lag die Proteinexpression im Vergleich zu den mit LK1 transfizierten Zellen bei $88,5 \pm 10,4\%$ (Abbildung 7).

Ergebnisse

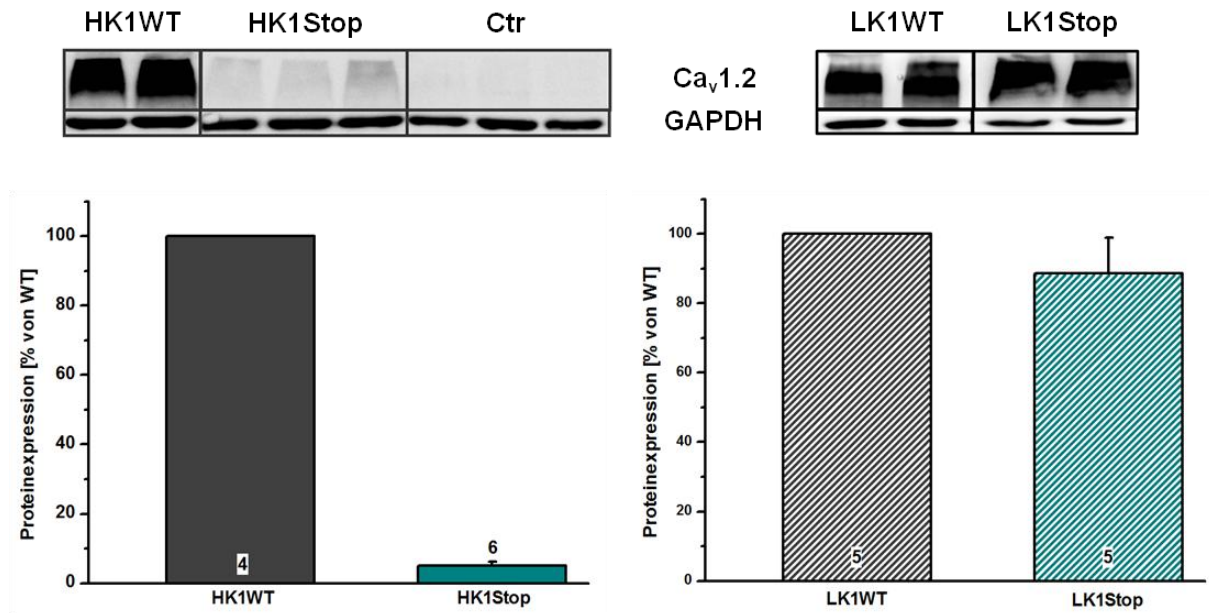


Abbildung 7 Oben: Beispielhafte Western Blots für HK1WT und HK1Stop (links) sowie LK1 und LK1Stop (rechts). Ctr: HEK 293T-Zellen transfiziert mit $\alpha_2\delta$ und β_2 . Als Ladungskontrolle dient GAPDH. Unten: Statistische Auswertung der Western Blots (jeweils mindestens 3 verschiedene Blots wurden ausgewertet).

Bei der Verwendung eines 6%igen Acrylamidgels zur besseren Auftrennung der Ca_v1.2 Banden der verschiedenen Mutanten zeigte LK1Stop wie zuvor erwartet eine Bande bei etwa 230 kDa, während die LK1 Wildtypkontrolle ein Signal bei etwa 260 kDa zeigt. HK1 zeigt wie LK1 eine Bande bei 260 kDa, dagegen war das Signal von HK1Stop entgegen der Erwartung erst bei etwa 150 kDa zu finden (Abbildung 8). Als Ladekontrolle diente GAPDH.

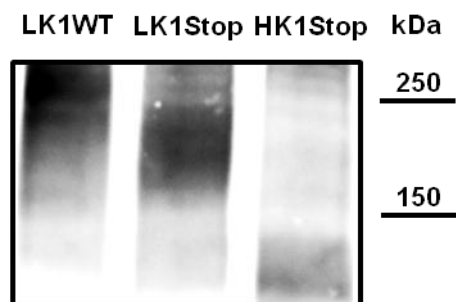


Abbildung 8 Western Blot von LK1WT, LK1Stop und HK1Stop auf einem 6%igem Acrylamidgel.

3.1.4. Proteasominhibitoren

Da HK1Stop im Western Blot eine $\text{Ca}_v1.2$ Bande zeigt, die nur sehr schwach und mit 150 kDa deutlich kleiner als erwartet ist, wurde untersucht, ob die verkürzte Bande auf einen proteolytischen Abbau zurückzuführen ist. Dazu wurde sowohl eine Kombination aus Lactacystin und MG132 als auch Bortezomib verwendet. HEK 293T -Zellen wurden mit HK1 Wildtyp und HK1Stop transfiziert und 36 h nach der Transfektion mit Lactacystin und MG132 oder mit Bortezomib behandelt. Nach einer Inkubation von 12 h wurden die Zellen mit PBS vom Boden der Zellkulturflasche abgespült, pelletiert und mit 2% SDS/50 mM Tris lysiert. Anschließend wurde die Proteinexpression im Western Blot auf einem 8% Acrylamidgel betrachtet. Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Präparationen von HK1 und HK1Stop aufgetragen.

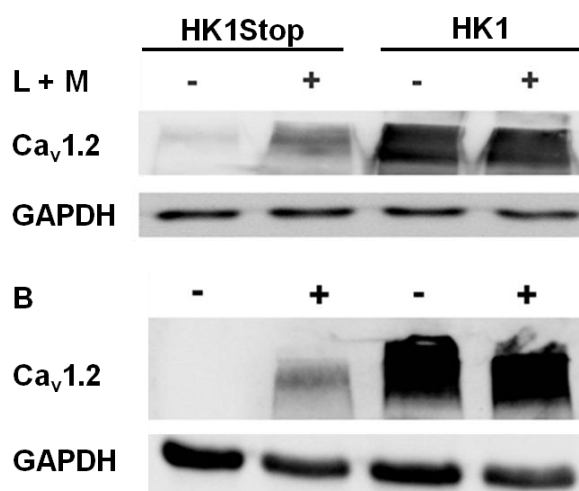


Abbildung 9 Western Blot aus HEK 293T-Zellen transfiziert mit HK1Stop oder HK1 Wildtyp, jeweils co-exprimiert mit β_2 und $\alpha_2\delta$ in Ab- und Anwesenheit von Proteasominhibitoren. L: Lactacystin, 10 μM ; M: MG132, 10 μM ; B: Bortezomib, 10 μM . Geladen sind jeweils 20 μg Gesamtprotein, GAPDH dient als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 9 zu sehen, konnte bei den mit Proteasominhibitor behandelten HK1Stop Zellen deutlich mehr $\text{Ca}_v1.2$ detektiert werden als in den unbehandelten Zellen, die Bande bleibt allerdings bei etwa 150 kDa und damit deutlich kleiner als erwartet. Außerdem lag auch in den behandelten Zellen die Expression des Calciumkanalproteins noch deutlich unter der im Wildtyp zu sehenden Expression. In den mit HK1 transfizierten Zellen zeigte sich ebenfalls ein leichter Anstieg in der Proteinexpression. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

3.1.5. LK4Stop-Expression in HEK 293T-Zellen

Aufgrund der deutlichen Unterschiede von HK1Stop und LK1Stop im Expressionsverhalten wurde in weiteren Experimenten untersucht, wie sich diese begründen lassen. Wie bei Welling et al. 1997 beschrieben, unterscheiden sich HK1 und LK1 in 4 Spleißregionen, die in LK1 allesamt enthalten sind, in HK1 jedoch nicht. LK4 ist ein Chimärvektor aus HK1 und LK1 und enthält den LK1 N-Terminus Spleißbereich, in Abbildung 10 mit A gekennzeichnet, entspricht jedoch in den drei anderen Spleißregionen B, C und D dem HK1-Vektor.

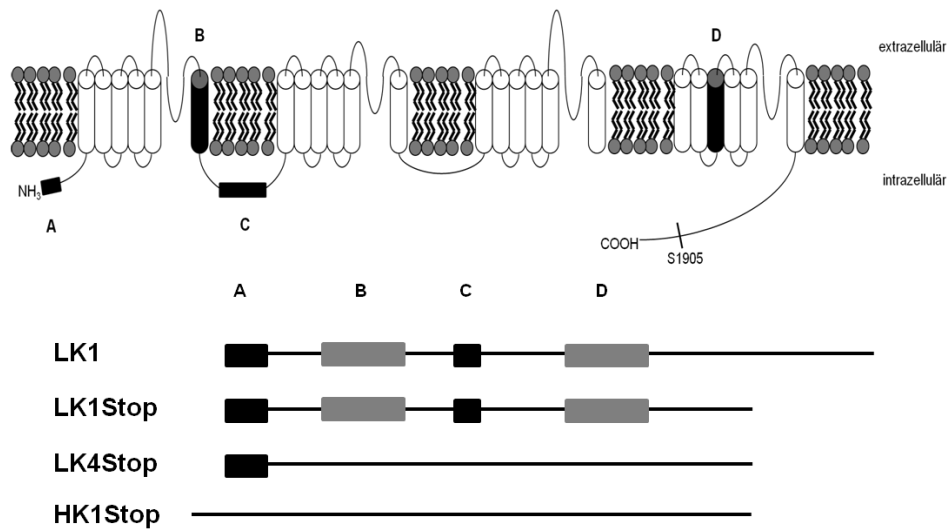


Abbildung 10 Schematische Darstellung der Spleißvarianten von $Ca_v1.2$.

Anhand von LK4 sollte nun die Auswirkung der Stopmutation auf diese Spleißvariante getestet werden. Dazu wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, das ATG-Stopcodon in LK4 eingefügt. Anschließend wurde LK4Stop in HEK 293T-Zellen exprimiert, zusammen mit den akzessorischen Untereinheiten $\alpha_2\delta$ und β_2 . Im Western Blot wurde die Expression von LK4Stop im Vergleich zu LK1Stop und LK1 betrachtet (Abbildung 11). LK4Stop zeigt ein etwa gleich starkes Signal für $Ca_v1.2$ verglichen mit LK1Stop, auch die Höhe der Bande stimmt mit etwa 200 kDa mit der von LK1Stop überein. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

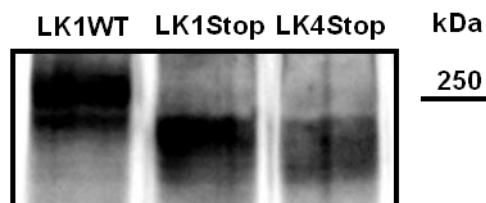


Abbildung 11 Western Blot von LK4Stop im Vergleich zu LK1 und LK1Stop auf einem 6%igem Acrylamidgel.

3.1.6. Elektrophysiologie an HEK 293T-Zellen

3.1.6.1. HK1Stop und HK1

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden von Herrn Jie Ding durchgeführt. Dazu wurden die HEK 293T-Zellen wie unter 2.5.2 beschrieben auf Poly-(L)-Lysin-beschichteten Plättchen ausgesät und transfiziert. Zunächst wurden mit HK1 und HK1Stop transfizierte Zellen verglichen. Das Pulsprotokoll sowie zwei beispielhafte Stromkurven zeigt Abbildung 12 links. Mit HK1Stop transfizierte Zellen zeigten kaum Bariumstrom I_{Ba} , wie in der Strom/Spannungs-Beziehung in Abbildung 12 rechts zu sehen. Die Stromdichte in den HK1Stop-transfizierten Zellen war damit hochsignifikant niedriger als in den Wildtyp-transfizierten Zellen.

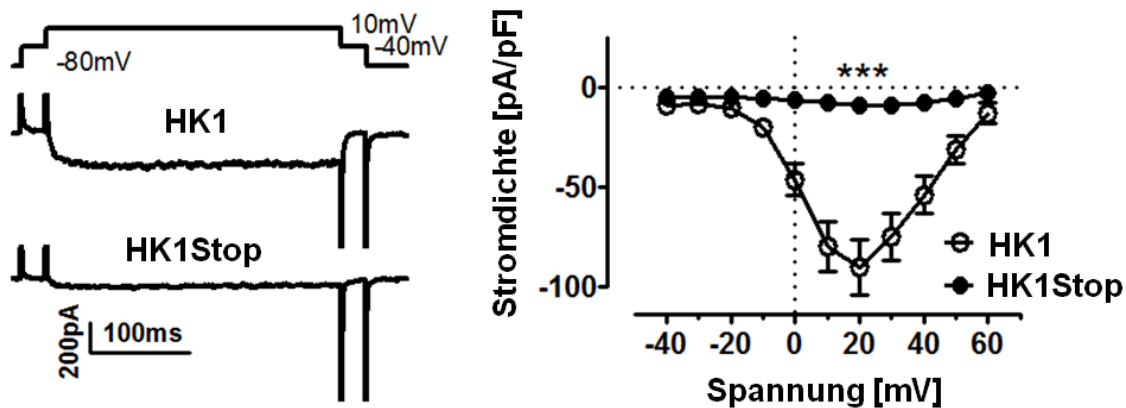


Abbildung 12 Links: Pulsprotokoll und Beispiele für die Stromkurven von HK1 und HK1Stop. Rechts: Strom/Spannungs-Beziehung von HK1 und HK1Stop gemessen mit Barium als Ladungsträger.

3.1.6.2. HK1Stop mit Proteasom-Inhibitor

Wurden die Zellen zuvor für die letzten 12 h mit Lactacystin (10 μ M) und MG132 (10 μ M) behandelt, so konnte der Bariumstrom in den HK1Stop-Zellen gesteigert werden (Abbildung 13). Betrachtet man die Stromdichten von HK1- und HK1Stop-transfizierten Zellen mit und ohne Behandlung mit Lactacystin und MG132, so führen die Proteaseinhibitoren bei HK1 nicht zu einer signifikanten Veränderung, während sich die Stromdichte bei HK1Stop durch die Behandlung mit den Proteasominhibitoren mehr als verdoppelte. Allerdings lag I_{Ba} für HK1Stop nach wie vor deutlich unter den für HK1 gemessenen Strömen, wie es zuvor auch die Western Blot-Resultate gezeigt hatten.

Ergebnisse

Da Lactacystin und MG132 jedoch auch einen apoptotischen Nebeneffekt zeigten, wurde auch der Proteaseinhibitor Bortezomib und dessen Effekt auf die Zellen getestet. Transfektion und Messungen erfolgten nach dem gleichen Protokoll. Zwar zeigte Bortezomib (10 μ M) keine apoptotischen Effekte auf die Zellen, doch auch hier konnte die Stromdichte in den HK1Stop-Zellen nicht weiter gesteigert werden (Abbildung 13, rechts). Der gemessene Strom war mit 1 μ M Isradipin blockierbar.

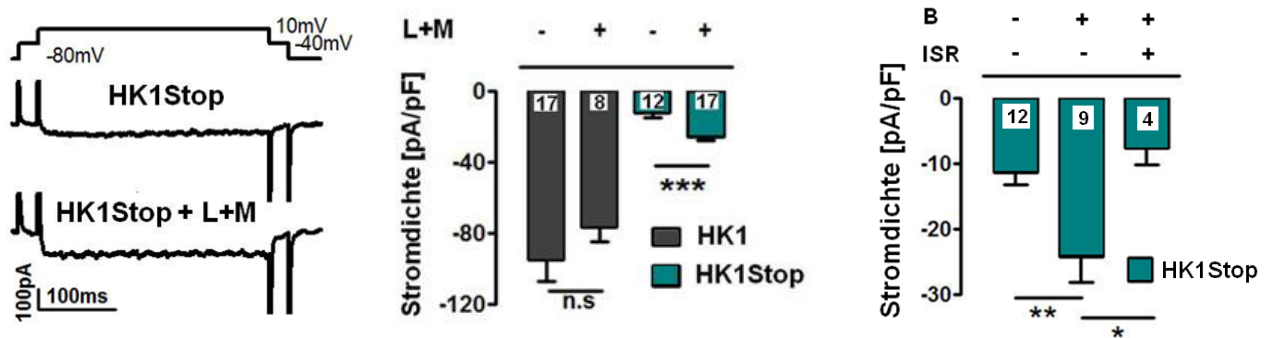


Abbildung 13 Links: Pulsprotokoll und Stromkurven für HK1Stop mit und ohne Inhibitorbehandlung. Mitte: Stromdichten für HK1 und HK1Stop mit und ohne Inhibitorbehandlung. L: Lactacystin (10 μ M), M: MG-132 (10 μ M). Rechts: Steigerung der Stromdichte von HK1Stop durch Bortezomib-Behandlung. Der gemessene Strom ist blockierbar mit Isradipin. B: Bortezomib (10 μ M), ISR: Isradipin (1 μ M).

3.1.6.3. LK1Stop und LK4Stop

Nach den Ergebnissen für LK1Stop- und LK4Stop-transfizierte HEK 293T-Zellen im Western Blot wurden auch für diese Konstrukte elektrophysiologische Untersuchungen vorgenommen. Wie schon der Western Blot vermuten ließ war die für LK1Stop und LK4Stop gemessene Stromdichte nicht von mit LK1 Wildtyp-transfizierten Zellen zu unterscheiden. Allerdings konnte auch hier durch die Trunkierung des Kanals keine Steigerung von I_{Ba} erzielt werden (Abbildung 14).

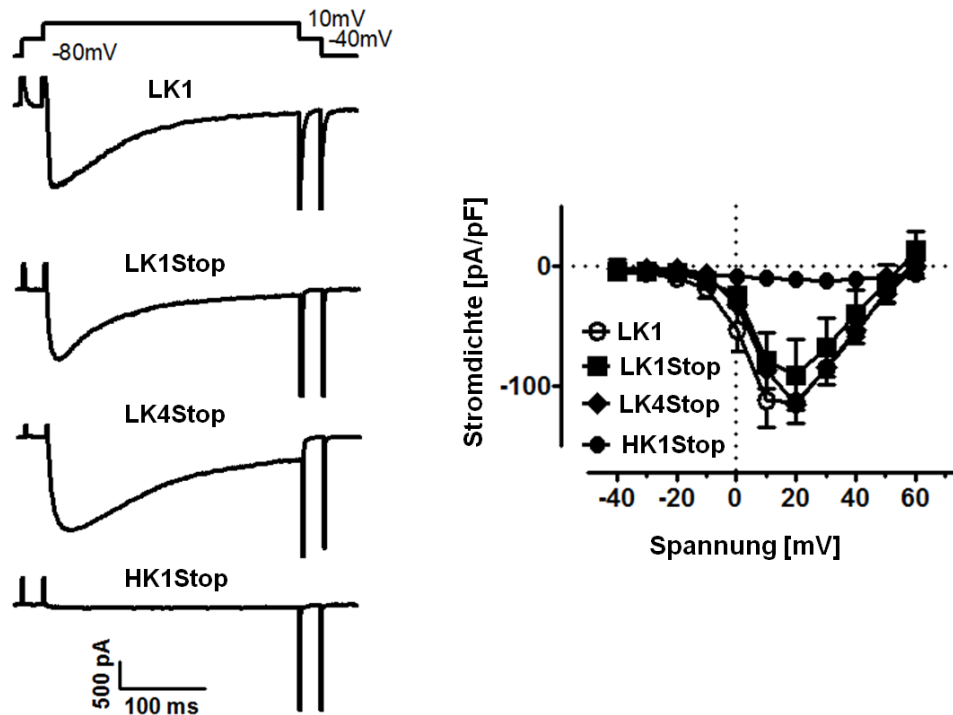


Abbildung 14 Links: Beispielhafte Stromkurven für LK1, LK1Stop, LK4Stop und HK1Stop zum Vergleich. Rechts: Stromdichten im Vergleich.

3.2. *In vivo*-Untersuchungen der Stop-Mutation

Um die Auswirkungen einer Trunkierung des $\text{Ca}_v1.2$ Kanalproteins *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Mauslinie erzeugt, bei der hinter Position Aspartat 1904, dem Analogon zu Serin 1905 im Kaninchengenom, drei Stopcodons eingeführt wurden.

Die aus heterozygoten Verpaarungen hervorgegangenen Nachkommen wurden an Tag 7 nach der Geburt (P7) biopsiert und diese Biopsie anschließend genotypisiert. In die Statistik in Abbildung 15 gehen für Tag P7 insgesamt 77 Würfe ein. Von 557 Nachkommen erwiesen sich knapp zwei Drittel, genauer 64,8% als heterozygot, 35,2% und damit gut ein Drittel waren homozygot für das Wildtypallel. Für $\text{Asp}^{1904}\text{Stop}$ homozygote Mäuse konnten an P7 nicht gefunden werden. Nach der Mendelschen Vererbungslehre hätten aber je ein Viertel der Mäuse homozygot für das Wildtypallel respektive das mutierte Allel sein müssen, weitere 50% der Tiere sollten heterozygot für die Mutation sein. Um festzustellen, an welchem Tag die für das Stop-Allel homozygoten Tiere sterben, wurden am Abend heterozygote Weibchen und Männchen miteinander verpaart und die Plug-positiven Weibchen am nächsten Morgen identifiziert.

Ergebnisse

Zu definierten Zeitpunkten der Schwangerschaft wurden die Weibchen euthanasiert, die Embryonen entnommen, biopsiert und im Anschluss genotypisiert. Dabei ergab sich, dass bis zum Tag 18,5 nach Verpaarung, also unmittelbar vor dem Zeitpunkt der Geburt, alle drei Genotypen bei den Nachkommen lebend zu finden waren. Wie Abbildung 15 zeigt, wurden bei 315 Embryonen aus insgesamt 32 schwangeren Weibchen Mendelsche Verhältnisse bei der Genotypenverteilung gefunden: 22,9% der Tiere zeigten zwei Wildtypallele, 55,2% waren heterozygot und 21,9% homozygot für die Stop - Mutation.

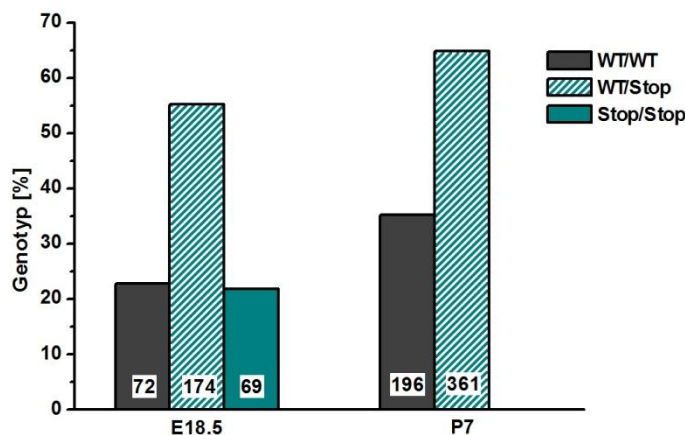


Abbildung 15 Genotypenstatistik an Tag E18,5 und 7 Tage nach der Geburt. In die Statistik gehen 32 Würfe für E18,5 und 77 Würfe für P7 ein.

3.2.1. Proteinexpression des $Ca_v1.2$ *in vivo*

Um den frühen Todeszeitpunkt der Stop-Mäuse zu klären, wurde zunächst die Proteinexpression von $Ca_v1.2$ in der Stop-Maus untersucht. Dazu wurden Embryonen an Tag 18,5 p.c. aus dem Uterus entnommen, die Herzen und Gehirne isoliert und bei -80°C eingefroren. Nachdem durch eine PCR-Analyse der Genotyp der Tiere ermittelt worden war, wurden jeweils 5 Herzen und Gehirne desselben Genotyps mittels SDS/Tris-Präparation aufgeschlossen und die Proteine über ein 8% Acrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion mit Anti- $Ca_v1.2$ Antikörper ergab eine sehr stark reduzierte Expression von $Ca_v1.2$ in den Stop-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Nachkommen. Bei $100\text{ }\mu\text{g}$ aufgetragenem Protein war sowohl in Präparationen von Stop-Herzen als auch von Stop-Gehirnen nur eine sehr schmale, schwache Bande für den $Ca_v1.2$ zu finden, während die Wildtyppräparationen eine deutliche, starke Bande zeigten (Abbildung 16).

Ergebnisse

Weitere Untersuchungen ergaben, dass für die Stop-Mutation heterozygote Tiere eine mit den Wildtyppräparationen vergleichbare Expression von $\text{Ca}_v1.2$ zeigten. Als Ladekontrolle diente p42/44 MAP-Kinase.



Abbildung 16 Western Blot aus Proteinpräparationen von embryonalen Herzen und Hirnen E15,5. Für jede Probe wurden jeweils 5 Herzen bzw. Hirne desselben Genotyps vereinigt. Als Ladekontrolle dient p42/44 MAPK.

3.2.2. mRNS-Untersuchungen *in vivo*

3.2.2.1. mRNS-Level von $\text{Ca}_v1.2$

Da die $\text{Ca}_v1.2$ Proteinexpression in den Stop-Embryonen stark reduziert ist, wurde untersucht, ob dies auch für die mRNS-Expression von *CACNA1C*, dem für $\text{Ca}_v1.2$ codierenden Gen, gilt. Dazu wurde mRNA an Tag 18,5 p.c. aus Herzen von Stop- und WT-Nachkommen mit Hilfe von DynaBeads isoliert. Im Anschluss daran wurde eine semiquantitative RT-PCR mit HighFidelity Polymerase durchgeführt, bei der für $\text{Ca}_v1.2$ spezifische Primer sowie Primer für GAPDH als interne Kontrolle verwendet wurden. Hier ergaben sich jedoch keine Unterschiede für die mRNS-Level von $\text{Ca}_v1.2$ in den verschiedenen Genotypen (Abbildung 17).

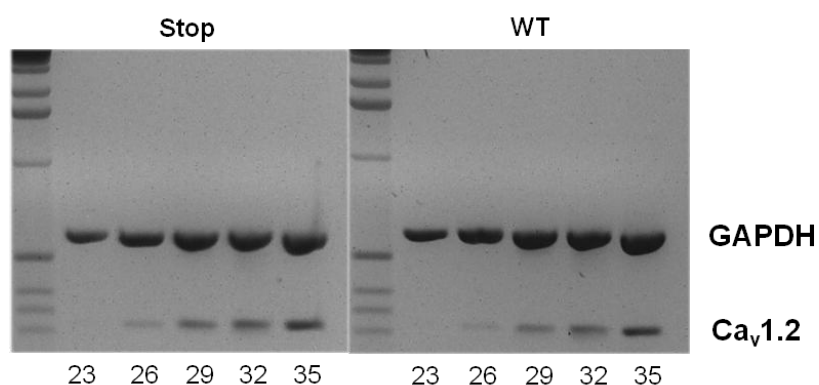


Abbildung 17 RT-PCR auf $\text{Ca}_v1.2$ und GAPDH als Kontrolle. Die RNS wurde aus embryonalen Herzen Tag E18,5 gewonnen und nach dem Umschreiben in cDNS als Template eingesetzt (1 μg).

3.2.2.2. $Ca_v1.3$ -Expression in Stop-Embryonen

Bereits früher wurde gezeigt, dass das Fehlen von $Ca_v1.2$ Protein im embryonalen Herzen zu einer gesteigerten Expression des $Ca_v1.3$ Calciumkanals führte (Seisenberger et al. 2000, Xu et al. 2003). Aufgrund des sehr geringen $Ca_v1.2$ -Proteinlevels in den Stop-Embryonen wurde hier ein ähnlicher Effekt auf $Ca_v1.3$ in Erwägung gezogen. Dazu wurde eine RT-PCR auf mRNS aus embryonalem Mausherz (Tag 18,5 p.c.) mit Primern durchgeführt, die für $Ca_v1.3$ spezifisch sind (Xu et al. 2003). Als interne Kontrolle diente hier HPRT. Auch hier konnte allerdings kein Unterschied der $Ca_v1.3$ mRNS-Expression zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden. Auch im Western Blot war die Proteinexpression von $Ca_v1.3$ für Stop-Herz an Tag E18,5 im Vergleich zu Wildtyp Herzen unverändert (Abbildung 18).

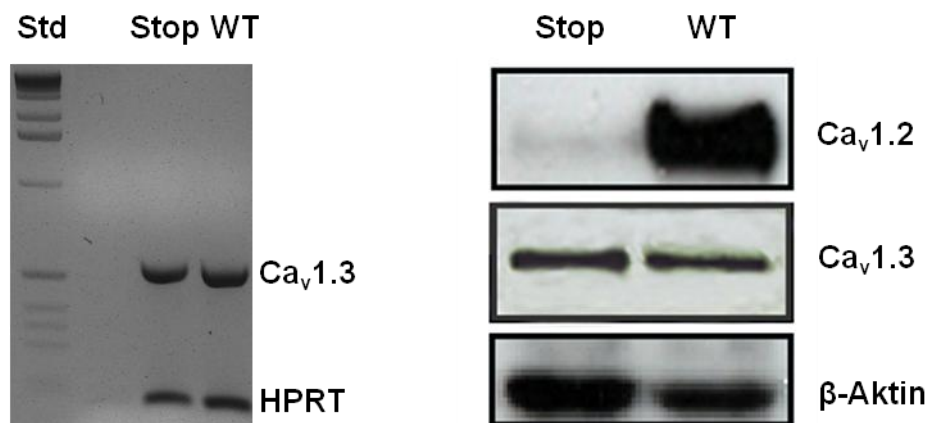


Abbildung 18 Links: RT-PCR auf $Ca_v1.3$ an mRNS von Stop- und Wildtyp Herzen. HPRT dient als Ladekontrolle. Rechts: Western Blot auf $Ca_v1.3$ mit Proben aus Herzgewebe von Stop- und Wildtyp Embryonen. β -Aktin dient als Ladekontrolle, $Ca_v1.2$ ist als Vergleich gezeigt.

3.2.3. Spleißvarianten im C-Terminus

Um zu überprüfen, ob die Einführung der Stop-Mutation zu alternativem Spleißen des C-Terminus führt, wurden Primerpaare designt, die jeweils zwei Exons des C-Terminus umfassen. Beginnend bei Exon 38 wurden PCRs auf mRNS von Stop- und Wildtyp Embryonen durchgeführt und auf einem PAGE-Gel betrachtet, wie in Abbildung 19 zu sehen. PCR A bezeichnet dabei das die Exone 38 und 39 umfassende Produkt, B steht für die Exone 40 und 41, C für 42 und 43, D für 44 und 45 sowie E für 46 und 47.

Ergebnisse

Auf dem PAGE-Gel könnten bereits sehr kleine Unterschiede in der Größe des PCR-Produkts detektiert werden, was auf alternatives Spleißen hindeuten würde, der einzige minimale Unterschied ergab sich jedoch für PCR D, welche das Exon 44 enthält. In Exon 44 befindet sich die Stop-Mutation, also ein zusätzliches Insert von 9 bp.

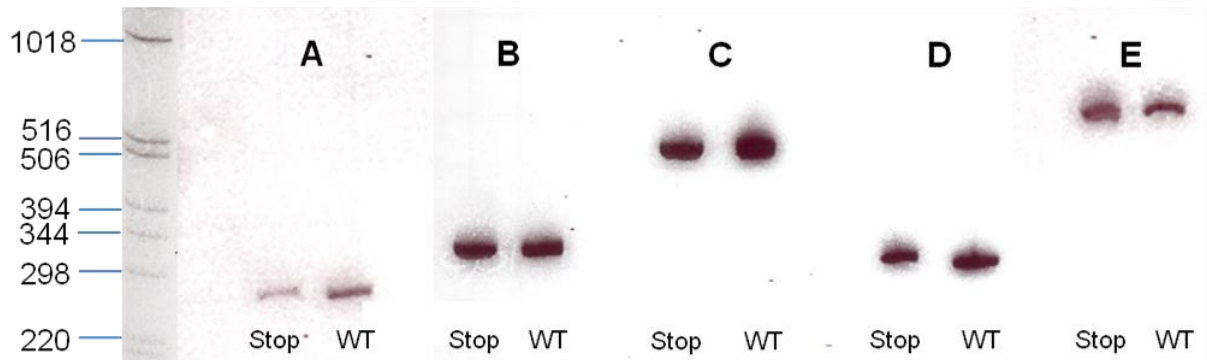


Abbildung 19 PCRs auf kurze, je zwei Exons umfassende Bereiche des C-Terminus, aufgetrennt über ein PAGE-Gel. A: Exon 38 und 39, B: Exon 40 und 41, C: Exon 42 und 43, D: Exon 44 und 45, E: Exon 46 und 47.

3.2.4. Ductus botalli-Färbung

Aufgrund des frühen Todeszeitpunkts kurz nach Geburt wurde eine Beteiligung des Ductus arteriosus Botalli in Erwägung gezogen. Dieser ist während der gesamten Embryonalzeit geöffnet und verbindet im Embryo den venösen mit dem arteriellen Kreislauf, um den Lungenkreislauf während der Embryonalentwicklung zu umgehen, was auch einer Druckentlastung des Herzens während dessen Entwicklung dient. Mit der ersten Ventilation der Lunge nach der Geburt wird ein Verschluss des Ductus botalli durch Vasokonstriktion initiiert. Ein vorzeitiger Verschluss dieses Gefäßes kann demnach zu einer schweren Herzschiädigung und letztlich zum Tod des Embryos führen. Um zu überprüfen, ob es in den Stop-Embryonen eventuell zu einem vorzeitigen Verschluss des Ductus botalli kommt, wurden heterozygote Stop/WT-Weibchen mit ebensolchen Männchen am Abend verpaart und die Plug-positiven Tiere am nächsten Morgen identifiziert. Die schwangeren Weibchen wurden an Tag 18,5 p.c. per Kaiserschnitt entbunden und die Neugeborenen unter eine Rotlichtlampe gelegt, um sie vor dem Auskühlen zu schützen. Die Neugeborenen wurden nacheinander euthanasiert, der Burstkorb geöffnet und blauer Farbstoff in den rechten Ventrikel injiziert, welche sich dann über die Aorta weiter ausbreitete. Dadurch konnte auch der geöffnete Ductus botalli angefärbt werden.

Ergebnisse

Sowohl in den Stop-Mäusen als auch in den heterozygoten und den Wildtypnachkommen konnte ein geöffneter Ductus beobachtet werden, der sich mit zunehmender Zeit nach dem Kaiserschnitt in allen drei Genotypen merklich verengte. Nach etwa 65 Minuten konnte überall ein Verschluss des Gefäßes unabhängig vom Genotyp beobachtet werden (Abbildung 20). Verschlussstörungen des Ductus botalli konnten somit als Todesursache ausgeschlossen werden.

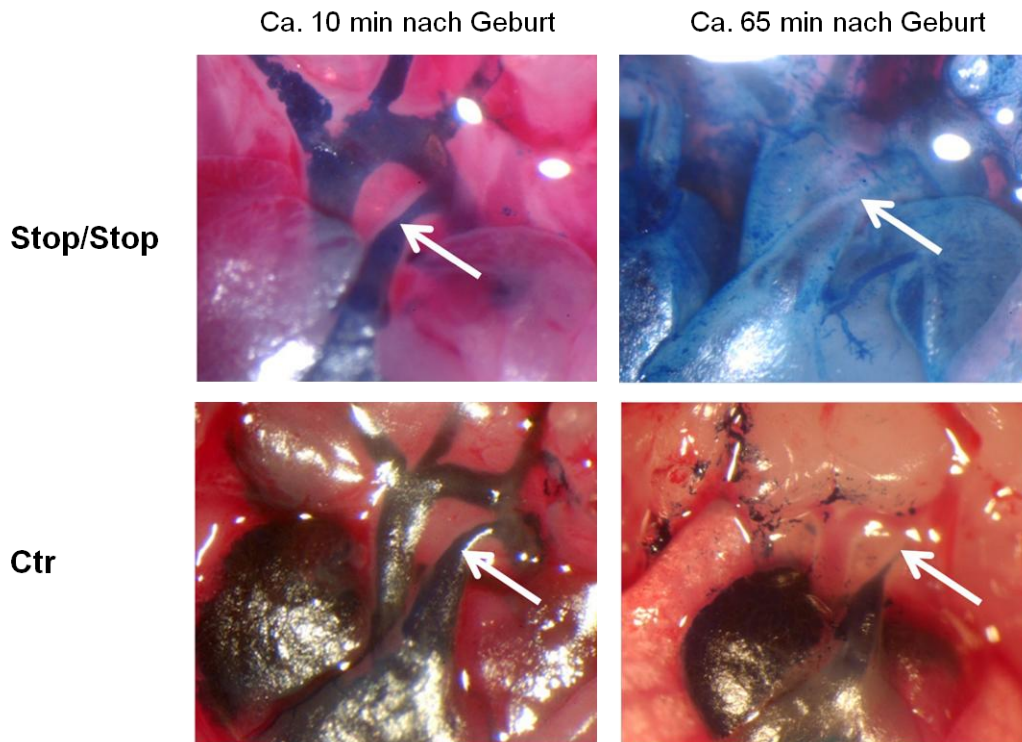


Abbildung 20 Ductus botalli-Färbung ca. 10 min (linke Seite) und ca. 65 min (rechte Seite) nach Geburt durch Kaiserschnitt. Obere Reihe: Stop/Stop, untere Reihe: WT/Stop als Kontrolle.

3.2.5. Paraffinschnitte an Herzen E18,5

Für histologische Untersuchungen der embryonalen Herzen wurden Paraffinschnitte von an Tag E18,5 isolierten Herzen angefertigt. Nach einer Masson-Trichrom-Färbung wurden die Schnitte mit einer Zeiss AxioCam digitalisiert und Ventrikelumfang sowie Septumdicke ausgemessen. Dabei ergab sich für Stop-Hezen ein Ventrikelumfang von $6,91 \pm 0,16$ mm, für Wildtypherzen lag der Ventrikelumfang bei $6,67 \pm 0,13$ mm (Abbildung 21 links). Für die Septumdicke ergaben sich $0,40 \pm 0,01$ mm für Stop-Hezen und $0,44 \pm 0,02$ mm für Wildtypherzen (Abbildung 21 rechts). Damit war weder für den Ventrikelumfang noch für die Septumdicke ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen. Die n-Zahl lag bei jeweils acht Embryonen.

Ergebnisse

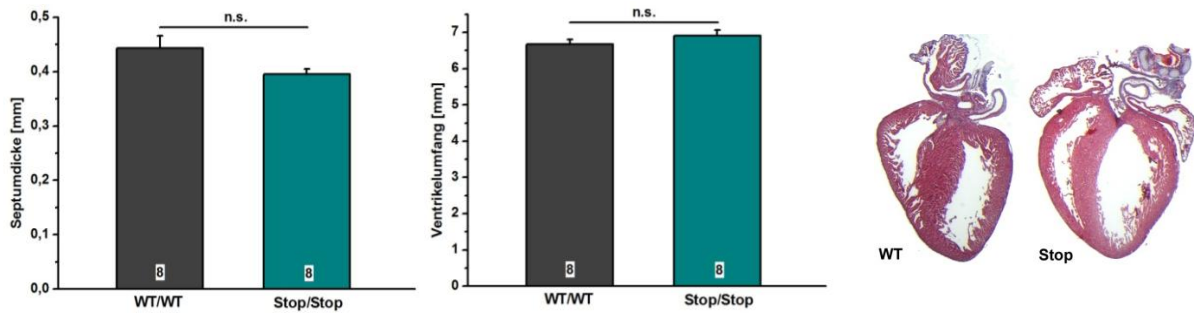


Abbildung 21 Septumdicke (links) und Ventrikelumfang (Mitte) embryonaler Herzen an Tag E18,5, ermittelt an Paraffinschnitten. Rechts: Beispiele für Paraffinschnitte von WT- und Stop-Hezen nach Trichromfärbung.

3.2.6. Elektrokardiogramm an Neugeborenen

Auch wenn die Histologie keinen Hinweis auf einen Herzphänotyp geben konnte, wurde weiter überprüft, ob die Ursache für den frühen Tod der Stop-Mäuse in der Funktionalität des Herzens liegt. Dazu wurden bei Neugeborenen, die an Tag E18,5 per Kaiserschnitt entbunden wurden, mittels eines äußerlich angebrachten Transmitters Elektrokardiogramme aufgenommen.

Abbildung 22 zeigt exemplarisch je eine EKG-Spur einer neugeborenen Wildtyp- und einer Stop-Maus. Anschließend wurde aus den EKG-Spuren die Herzfrequenz der Tiere ermittelt (Abbildung 22, rechts). Die Messungen wurden verblindet durchgeführt, da der Genotyp der Neugeborenen erst anschließend mittels PCR ermittelt wurde. Die EKG-Spuren der Stop-Mäuse zeigten dabei unregelmäßige Abfolgen der QRS-Komplexe, während bei den Wildtyptieren keine Arrhythmien zu beobachten waren. Die Herzfrequenz der Stop-Nachkommen lag bei $124,8 \pm 27,7$ Schlägen pro Minute und damit signifikant niedriger als die der Wildtyptiere, für die Herzfrequenzen von $295,0 \pm 33,9$ Schlägen pro Minute gemessen wurden. Heterozygote Tiere zeigten mit $309,9 \pm 14,6$ Schlägen pro Minute keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyptieren.

Ergebnisse

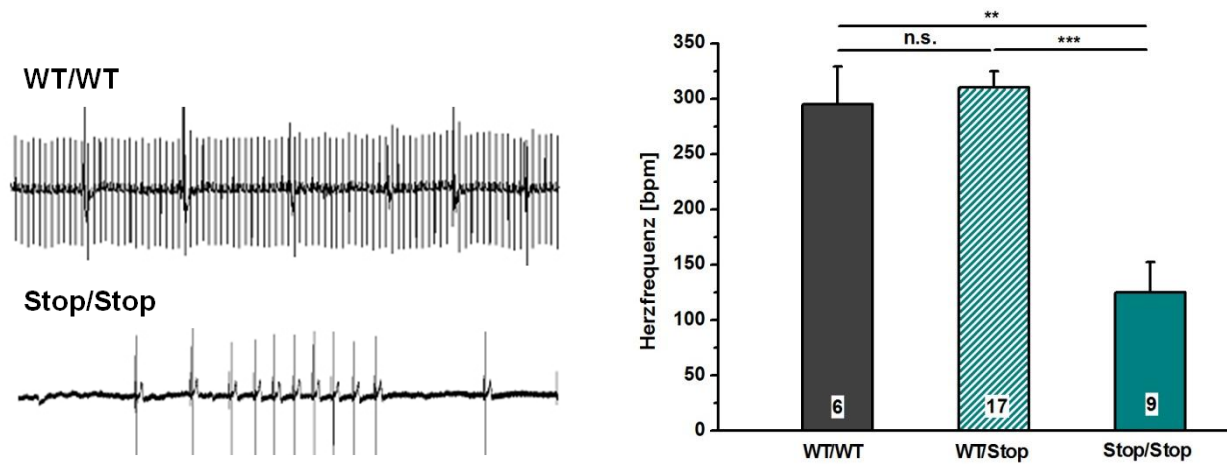


Abbildung 22 Links zu sehen sind beispielhafte EKG-Spuren von Wildtypneugeborenen (oben) und Stop/Stop-Neugeborenen (unten). Rechts: Auswertung der Herzfrequenz neugeborener Tiere.

Dagegen konnte bei Untersuchungen an Tag E15,5 für die Auszählung der Herzschläge an isolierten Herzen kein Unterschied in der Frequenz zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden (Abbildung 23). Hier lagen die Herzfrequenzen bei $55,9 \pm 2,3$ Schlägen pro Minute bei Wildtyptieren, $56,5 \pm 2,8$ Schlägen pro Minute für Stop-Tiere und bei $53,8 \pm 2,1$ Schlägen pro Minute für heterozygote Nachkommen.

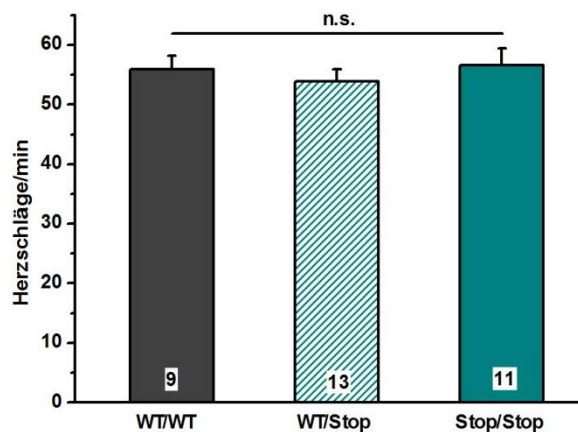


Abbildung 23 Schlagfrequenz von embryonalen Herzen an Tag E15,5. Die Herzschläge wurden an isolierten Herzen in ADS-Puffer supplementiert mit 1,8 mM CaCl_2 bei 37°C bestimmt.

3.2.7. Messung der kardialen Kontraktionskraft

Da die Herzfrequenzen der drei Genotypen an Tag E15,5 nicht unterschiedlich waren, die für die Stop-Mutation homozygoten Tiere nach der Geburt aber eine deutlich niedrigere Frequenz und starke Arrhythmien zeigten, wurde die Kontraktionskraft der Herzen untersucht. Dazu wurden wiederum heterozygote Elterntiere verpaart und an Tag E18,5 ein Kaiserschnitt durchgeführt.

Ergebnisse

Die Herzen der Neugeborenen wurden entnommen und die Ventrikel apikal und zwischen den Vorhöfen auf Nähseide aufgezogen, um sie so in den Organbädern eines Myographen an den Kraftabnehmern zu befestigen. Anschließend wurden die spontanen Kontraktionen der Herzen über einen Computer aufgezeichnet. Während sich die Kontraktionskraft von Wildtypherzen und den Herzen heterozygoter Tiere nicht unterschied und durchschnittlich bei $5,3 \pm 0,8$ mN für Wildtypen und $5,5 \pm 0,5$ mN für Heterozygote lag, zeigten die Herzen der homozygoten Stop-Tiere mit $2,7 \pm 0,3$ mN eine um etwa 50% reduzierte Kontraktionskraft (Abbildung 24). Die Messungen wurden verblindet durchgeführt, der Genotyp der Tiere wurde im Anschluss mittels PCR bestimmt.

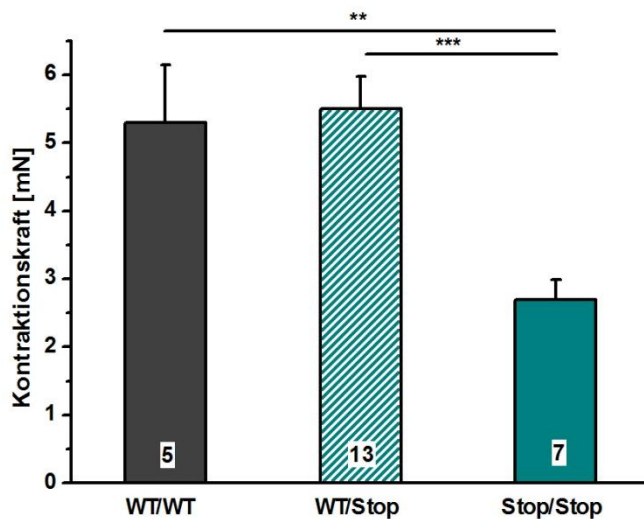


Abbildung 24 Kontraktionskraftmessungen an Herzen neugeborener Mäuse mittels eines Myographen.

3.2.8. Elektrophysiologie an embryonalen Cardiomyocyten

3.2.8.1. Basalmessungen an embryonalen Cardiomyocyten

Die elektrophysiologischen Messungen an embryonalen Cardiomyocyten wurden von Herrn Jie Ding durchgeführt. Die embryonalen Cardiomyocyten wurden an Tag 15,5 p.c. isoliert und für 24 h in Kultur gehalten. Die Genotypisierung erfolgte nach Durchführung der Messungen. Abbildung 25 zeigt auf der linken Seite das verwendete Pulsprotokoll sowie beispielhafte Aufzeichnungen von I_{Ba} aller drei Genotypen. Wie die Strom-Spannungsbeziehung in Abbildung 25 rechts zeigt, lag die Stromdichte in Stop/Stop-Cardiomyocyten mit durchschnittlich 20 pA/pF signifikant unter der in Wildtypcardiomyocyten mit 80 pA/pF.

Eine geringe, aber dennoch signifikante Verringerung in der Stromdichte war auch bei den heterozygoten Cardiomyocyten zu beobachten.

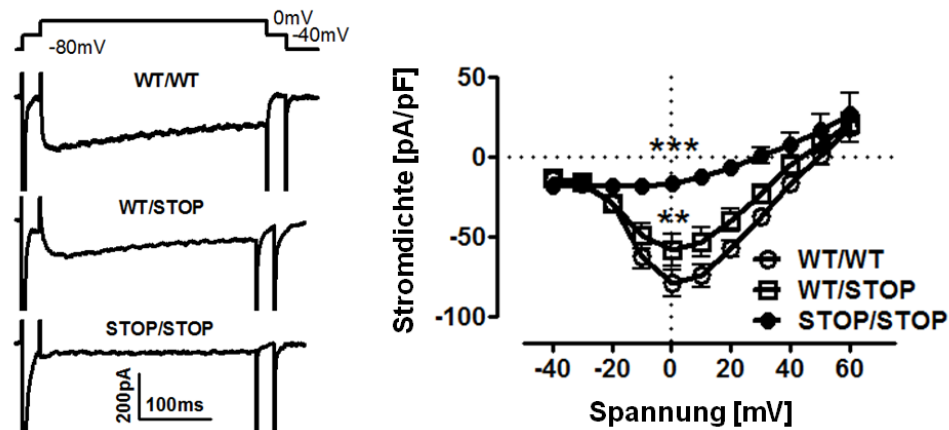


Abbildung 25 Links: Pulsprotokoll und Beispiele für die Stromkurven von WT/WT, WT/Stop und Stop/Stop Cardiomyocyten. Rechts: Stromdichten der Cardiomyocyten im Vergleich.

3.2.8.2. Behandlung embryonaler Cardiomyocyten mit Bortezomib

Wie schon bei den mit HK1Stop-transfizierten HEK-Zellen wurden auch die embryonalen Cardiomyocyten mit dem Proteasominhibitor Bortezomib behandelt, um damit eventuell einen Rescue des $Ca_v1.2$ Kanals zu erzielen. Während sich, ähnlich wie in den HEK 293T-Zell-Experimenten, für die Wildtyp- und die heterozygoten Cardiomyocyten durch die Zugabe von 10 μ M Bortezomib keine Veränderungen in der Stromdichte ergaben, konnte für Stop/Stop eine Verdoppelung der Stromdichte unter Bortezomib-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 26). Auch hier konnten allerdings die Werte der Wildtypzellen nicht erreicht werden.

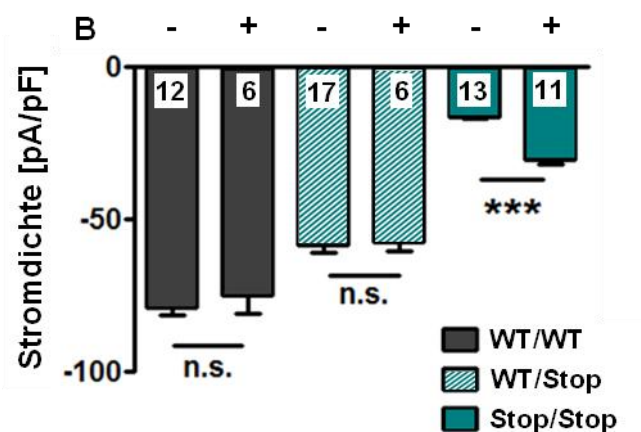


Abbildung 26 Stromdichten für embryonale Cardiomyocyten aus WT/WT-, WT/Stop- und Stop/Stop-Mäusen mit und ohne Inhibitorbehandlung. B: Bortezomib (10 μ M).

3.3. Herzspezifische Trunkierung in adulten Mäusen

3.3.1. Generierung gewebsspezifischer Stop-Mäuse

Um die Auswirkungen der Stop-Mutation auf das Mausherz näher untersuchen zu können, wurden Mäuse gezüchtet, bei denen durch den konditionalen Knockout des geflochten Wildtypallels nur noch die trunkierte Form des $\text{Ca}_v1.2$ exprimiert wird. Dazu wurden, wie in Abbildung 27 zu sehen, zunächst Mäuse mit einem geflochten (L2) und einem Wildtypallel für *CACNA1C* mit MerCreMer-Mäusen verpaart. Tiere, die jeweils heterozygot für das $\text{Ca}_v1.2$ -L2-Allel und für MerCreMer waren, wurden dann wiederum mit für die Stop-Mutation heterozygoten Tieren verpaart. Daraus resultierten Mäuse mit je einem geflochten und einem Stop-Allel für $\text{Ca}_v1.2$, die außerdem heterozygot für MerCreMer waren. Als Kontrollen wurden Littermates mit je einem Wildtyp- und einem geflochten Allel sowie MerCreMer eingesetzt. Abbildung 27 zeigt nochmals zusammengefasst das Verpaarungsschema. Kontrollen und Versuchstiere lebten und vermehrten sich normal nach den Mendelschen Gesetzen.

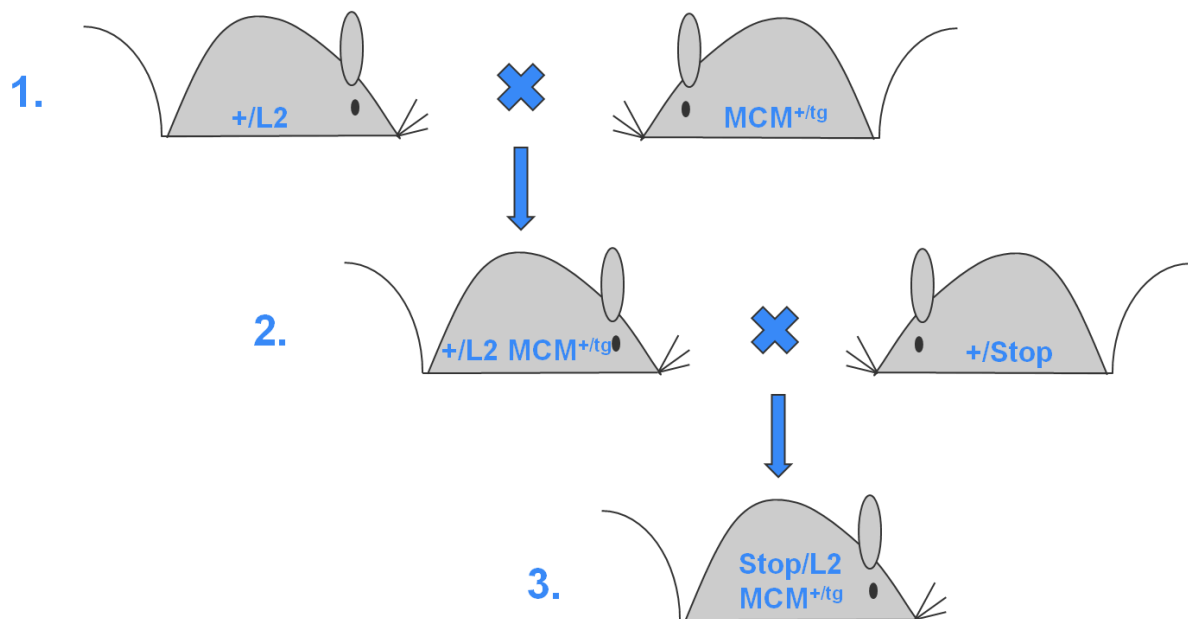


Abbildung 27 Verpaarungsschema zur Erzeugung von Mäusen mit herzspezifischer Trunkierung des $\text{Ca}_v1.2$ Calciumkanals. L2: doppelt gefloxtes $\text{Ca}_v1.2$ Allel; MCM: MerCreMer; tg: transgen; +: Wildtypallel des $\text{Ca}_v1.2$.

Durch Injektion von Tamoxifen in Mygliol (0,2 mg/30 g Maus/Tag) an vier aufeinander folgenden Tagen wurde die Cre-Rekombinase aktiviert, die das geflochte L2-Allel zu einem funktionsuntüchtigen L1-Allel zerschneidet.

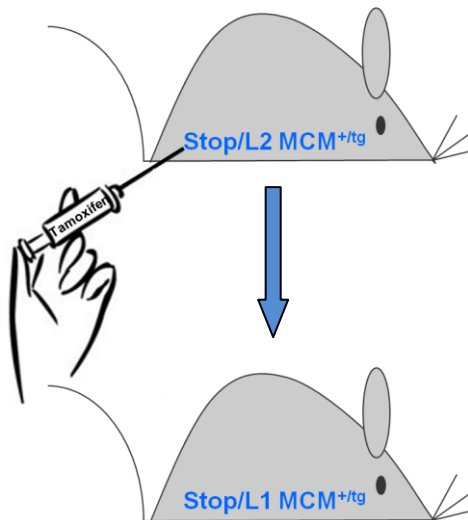


Abbildung 28 Durch Injektion von 0,2 mg Tamoxifen/30 g Maus/Tag wird die Expression der Cre-Rekombinase unter dem MHC-Promotor aktiviert, diese zerschneidet das L2-Allel zum funktionsuntüchtigen L1-Allel.

Da die Cre-Rekombinase unter dem MerCreMer-Promoter aber nur in den Herzventrikeln exprimiert wird, wird herzspezifisch nur noch der trunkierte $Ca_v1.2$ Kanal gebildet, in allen anderen Geweben liegt weiterhin auch $Ca_v1.2$ Wildtypprotein vor. Auch den Kontrolltieren wurde Tamoxifen nach dem gleichen Protokoll injiziert, hier wird im Herzen aber nach wie vor das ungefloxtes Wildtypallel exprimiert.

3.3.2. Kaplan-Meier-Überlebensstatistik

Während die Tamoxifeninjektionen das Überleben der Kontrolltiere nicht zu beeinträchtigen schienen, verstarben alle Versuchstiere in den auf die Injektionen folgenden Tagen oder Wochen. Der Kaplan-Meier-Überlebensplot in Abbildung 29 zeigt, dass 17 Tage nach der ersten Tamoxifeninjektion bereits 50% der männlichen Versuchstiere tot waren, innerhalb von 40 Tagen verstarben auch die restlichen männlichen Versuchstiere. Bei den weiblichen Versuchstieren dauerte es etwas länger, nämlich 34 Tage, bis 50% verstorben waren, nach 70 Tagen war auch bei den Weibchen das letzte Versuchstier verstorben. Bei den Kontrolltieren überlebten 100% der beobachteten Männchen und Weibchen.

Ergebnisse

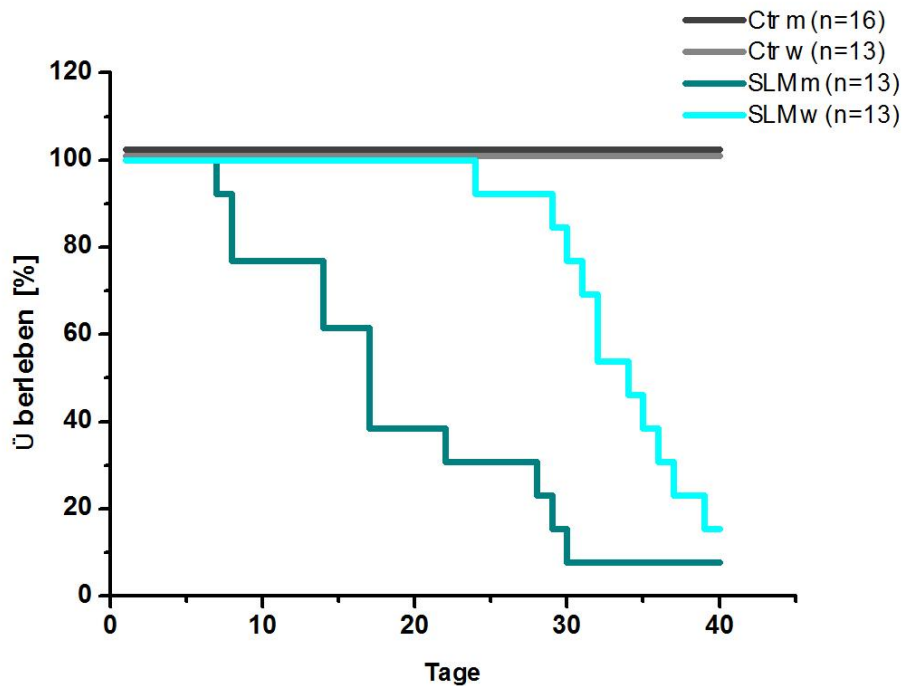


Abbildung 29 Überlebensstatistik von Stop/L2 MerCreMer-Männchen und -Weibchen sowie Kontrolltieren. Tag 1 beschreibt den Tag der ersten Tamoxifeninjektion, die Zahl der Überlebenden ist in Prozent der jeweiligen Ausgangstierzahl berechnet.

3.3.3. Proteinanalyse

3.3.3.1. Proteinanalyse bei Tod

Den verstorbenen Versuchstieren wurde unmittelbar nach ihrem Tod das Herz entnommen und bei -80°C eingefroren. Die Kontrolltiere wurden nach Versterben der jeweiligen Versuchstierkohorte euthanasiert, das Herz entnommen und ebenfalls bei -80°C eingefroren. Im Anschluss wurde eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Der Gesamtproteinauszug wurde über ein 8%iges Acrylamidgel aufgetrennt und die Membran nach dem Blotting mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Untersucht wurden $\text{Ca}_v1.2$, GAPDH, MAP-Kinase und Phospho-MAP-Kinase. Bei den Versuchstieren zeigte sich eine deutliche Reduktion an $\text{Ca}_v1.2$ -Protein zum Zeitpunkt des Todes, durchschnittlich waren aber, verglichen mit den Kontrollproben, noch immer 30% Kanalprotein nachzuweisen (normalisiert auf GAPDH). Während sich die Expressionslevel von MAP-Kinase bei den Versuchstieren und den Kontrollen nicht zu unterscheiden schienen, zeigten die Versuchstiere kaum noch Banden für die phosphorylierte Form der MAP-Kinase.

Ergebnisse

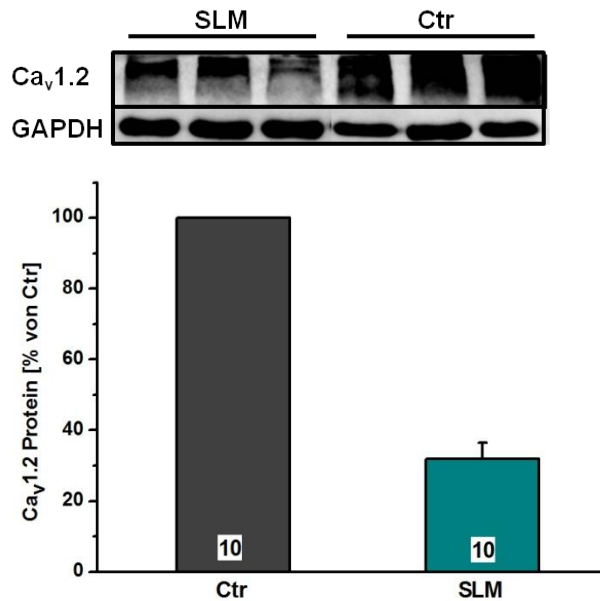


Abbildung 30 Ca_v1.2-Protein in Kontrolltieren und Versuchstieren bei Tod, normalisiert auf GAPDH. Die Ca_v1.2-Expression in den Versuchstierherzen ist angegeben als Prozent von Kontrolle.

3.3.3.2. Proteinanalyse an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion

Um Versuchs- und Kontrolltiere zu einem definierten Zeitpunkt vergleichen zu können, wurde die Proteinexpression auch an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion untersucht, da hier zwar noch die meisten Versuchstiere am Leben waren, Vorversuche aber schon deutliche Veränderungen im Kontraktionsverhalten gezeigt hatten (siehe Fractional shortening). Dazu wurden Versuchstiere und Kontrollen an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion euthanasiert, die Herzen entnommen und wie zuvor das Gesamtprotein extrahiert und über ein 8%iges Acrylamidgel aufgetrennt. Bereits an Tag 10 zeigten die Versuchstiere verglichen mit den Kontrollen eine deutliche Reduktion des Ca_v1.2 Proteins, wie Abbildung 31 zeigt. Der Verlust an Ca_v1.2 Protein war in den einzelnen Versuchstieren unterschiedlich weit fortgeschritten. Die MAP-Kinase-Expression unterschied sich nicht bei Kontrollen und Versuchstieren, für die phospho-MAP-Kinase waren aber auch schon an Tag 10 deutlich abgeschwächte Banden bei den Versuchstieren zu beobachten.

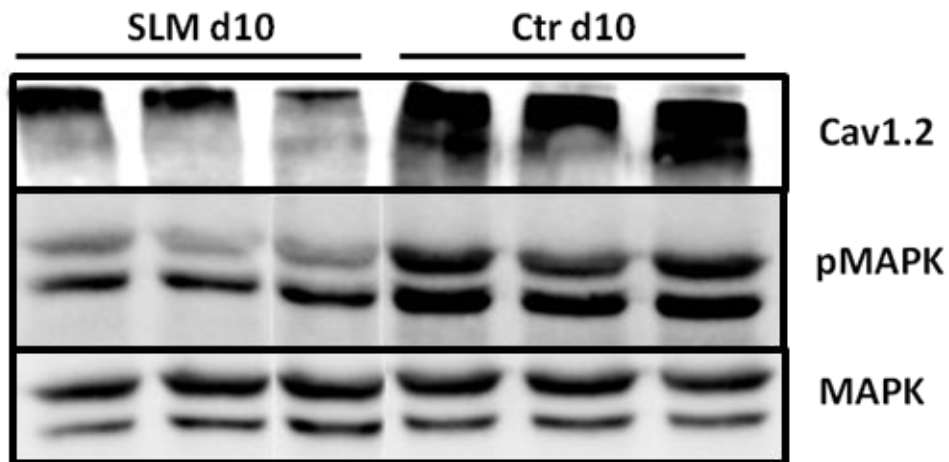


Abbildung 31 Western Blot von Versuchstier- und Kontrollherzen Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion.

3.3.4. Histologische Untersuchungen

3.3.4.1. Morphometrie der Herzen

Beim Entnehmen der Herzen aus den Versuchstieren fiel auf, dass sie bei Tod stark vergrößert waren. Daher wurden sowohl an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion als auch bei Tod Herzen von Versuchstieren und den zugehörigen Kontrollen entnommen und in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Im Anschluss wurden Paraffinschnitte der Herzen angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden nach einer Masson Trichrom-Färbung unter dem Mikroskop fotografiert und vermessen (Abbildung 32). Anhand dieser Fotos wurden Septumdicke und Wanddicke gemessen. Die Septumdicke und die Wanddicke nahmen in den Versuchstieren um rund 35% bzw. 25% ab. Auch der Ventrikelumfang wurde bestimmt, er war bei den Herzen der Versuchstiere um etwa 20% erhöht. Anhand der Herzschnitte konnte außerdem beobachtet werden, dass die Vorhöfe der Herzen eine starke Vergrößerung und dazu vermehrte Thrombenbildung aufwiesen.

Ergebnisse

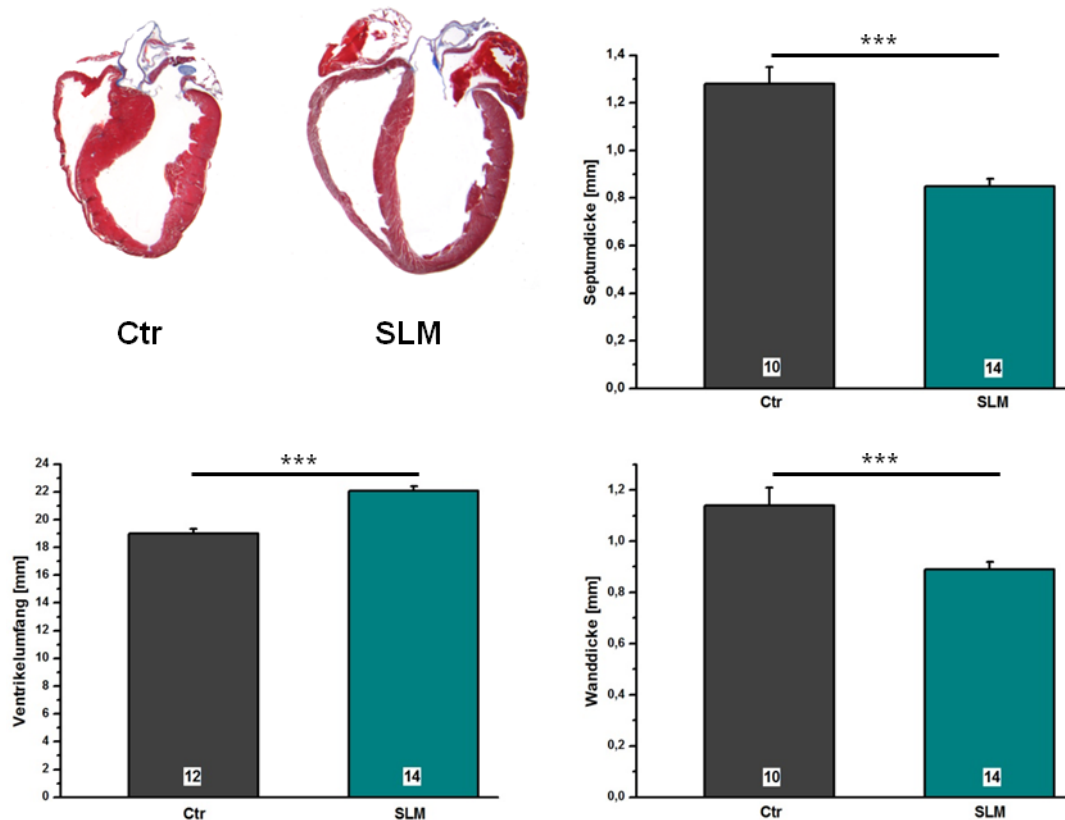


Abbildung 32 Oben links: Beispiele für Herzschnitte von Kontrolltieren (Ctr) und Versuchstieren (SLM). Links unten und rechts: Auswertung von Ventrikellumfang (gesamt), Septumdicke und Wanddicke in Kontroll- und Versuchstieren.

3.3.4.2. Trichromfärbung

Die Schnitte wurden nach der Trichromfärbung bei 40facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei konnten Bindegewebeinlagerungen beobachtet werden, die durch die Färbung blau geworden waren und die bei Herzhypertrophie vermehrt auftreten. Die Herzen der Versuchstiere wiesen diese vermehrten Bindegewebeinlagerungen auf, allerdings waren auch bei den Kontrolltieren blaue Einfärbungen zu sehen. Wie weitere Versuche mit MerCreMer-Tieren zeigten, kann die vermehrte Bindegewebeinlagerung durch die Expression der Cre-Rekombinase unter dem MHC-Promotor erklärt werden.

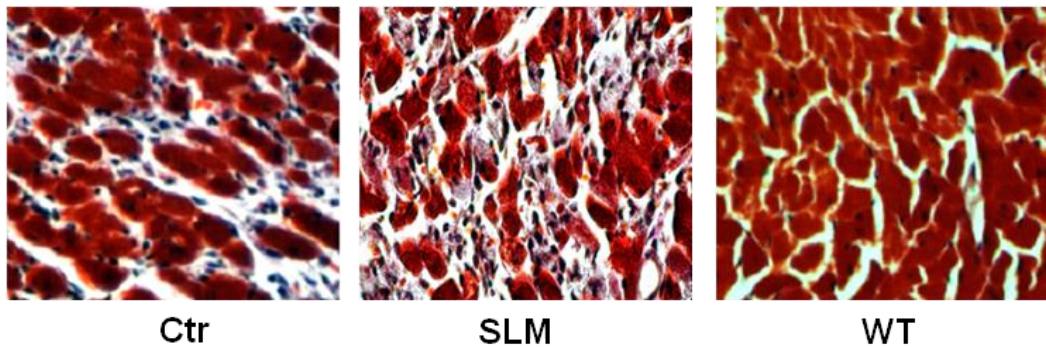


Abbildung 33 Trichromfärbung von Paraffinschnitten. Links: Kontrolltier (Ctr), Mitte: Versuchstier (SLM), rechts: Wildtyp (WT) ohne MerCreMer.

3.3.5. Semiquantitative PCRs auf Hypertrophiemarker

Um die Möglichkeit einer Herzhypertrophie weiter zu verfolgen, wurde die RNS der Versuchstiere und der Kontrollen auf Hypertrophiemarker untersucht. Die RNS wurde an Tag 15 nach der ersten Tamoxifeninjektion aus den Ventrikeln von Versuchstieren und Kontrollen unter Verwendung des peqGOLD RNA Pure Kits isoliert. Anschließend wurde die RNS in cDNS umgeschrieben und die Konzentration der cDNS-Proben mit dem NanoDrop gemessen. Für die PCR-Analysen auf Hypertrophiemarker wurde jeweils 1 µg cDNS eingesetzt, die PCR wurde mit VWR - Taq durchgeführt. Getestet wurde auf ANP, BNP, Myh6, Myh7 und Serca, in jedem Ansatz wurde außerdem GAPDH als interner Standard bestimmt. Proben wurden zu jeweils fünf Zyklen (23, 26, 29, 32 und 35) genommen und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Alle Proben wurden auf die jeweilige HPRT-Kontrolle normalisiert. Für alle fünf getesteten Hypertrophiemarker ergaben sich jedoch zwischen Kontroll- und Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel (Abbildung 34).

Ergebnisse

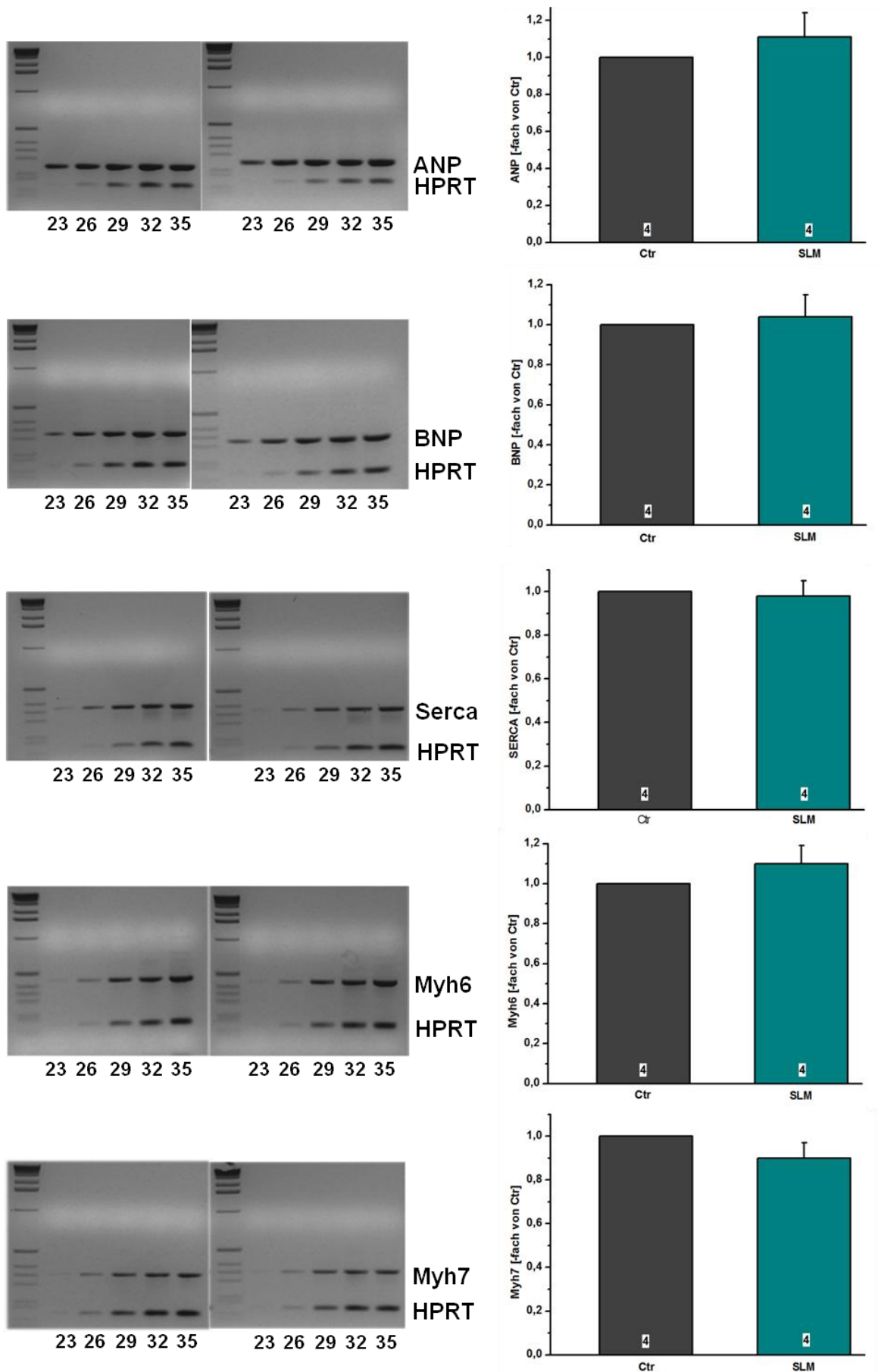


Abbildung 34 Linke Seite: Beispielbilder für semiquantitative RT - PCRs von ANP, BNP, Serca, Myh6 und Myh 7. Rechte Seite: Statistische Auswertung der RT-PCRs.

3.3.6. Fractional Shortening

Um den Einfluss der Stop-Mutation auf die Kontraktionskraft und damit die Funktionalität des Herzens zu untersuchen, wurde an sedierten Versuchstieren und Kontrollen das Fractional Shortening (FS) im Ultraschall gemessen. Die Messungen wurden einmal basal vor den Tamoxifeninjektionen und anschließend an Tag 10 nach der ersten Injektion gemessen. Wie Abbildung 35 zeigt, waren die basalen Messwerte nicht unterschiedlich und lagen für die Kontrollen bei $37,8 \pm 1,2\%$ sowie bei $36,6 \pm 1,0\%$ für die Versuchstiere. An Tag 10 war das FS in den Versuchstieren mit $18,4 \pm 1,2\%$ auf rund 50% verglichen zum Basalwert reduziert. Allerdings konnte auch in den Kontrolltieren eine leichte Reduktion um rund 20% auf $29,5 \pm 1,1\%$ im FS beobachtet werden, diese Werte lagen aber dennoch signifikant über denen der Versuchstiere. Messungen zu späteren Zeitpunkten zeigten einen noch stärkeren Rückgang des FS bei den Versuchstieren, allerdings konnten diese Messungen nicht im größeren Maßstab durchgeführt werden, da die Sedierung bei den kardial stark geschwächten Mäusen oftmals zum Tod führte.

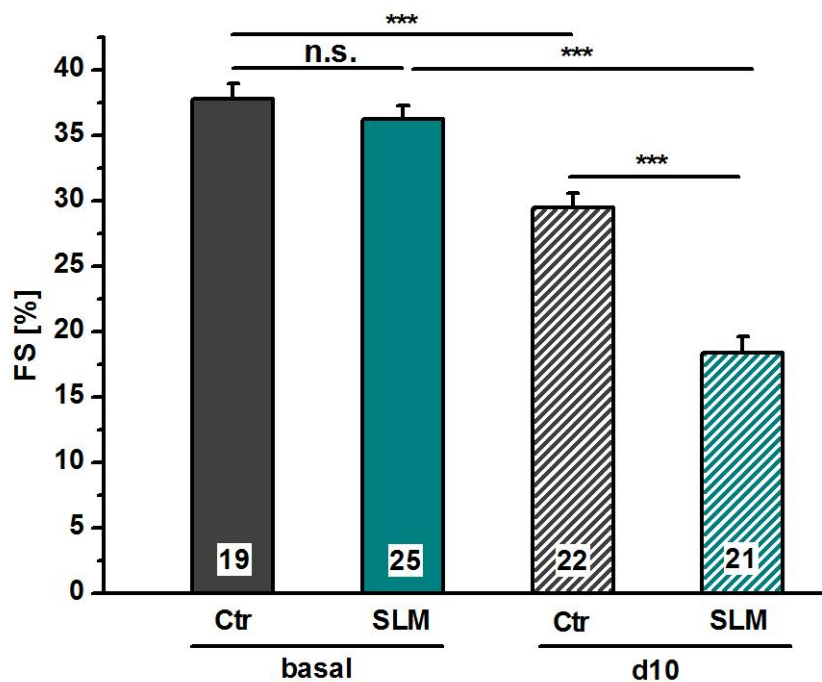


Abbildung 35 Fractional shortening von Kontroll- und Versuchstieren basal und an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion.

3.3.7. Elektrokardiogramm an herzspezifisch trunkierten Tieren

Näheren Aufschluss über die Veränderung der Herzfunktion sollte ein EKG geben. Dazu wurde Versuchstieren ein EKG-Transmitter in den Bauchraum implantiert. Zwei Wochen nach der Operation wurde zunächst das basale Elektrokardiogramm aufgezeichnet. Dabei wurde die Intervallmessung verwendet, das heißt, von jeder Minute wurden 20 sec aufgezeichnet. Die Aufzeichnung erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 48 h. Im Anschluss wurde mit den Tamoxifeninjektionen begonnen, die wie schon in den vorangegangenen Experimenten an 4 aufeinander folgenden Tagen verabreicht wurden. Auch während dieser Zeit wurde das EKG im Intervallmodus aufgezeichnet. Die Messungen wurden bis zum Tod der Versuchstiere fortgeführt. Aus den Basalmessungen und den Aufzeichnungen kurz vor dem Tod der Tiere wurde das R-R-Intervall ausgemessen. Als Zeitpunkt für die Messung kurz vor Tod wurde 30 min vor Tod gewählt und ab da 5 min ausgewertet, für die Auswertung der Basalmessungen wurde ein ebenfalls 5 min langes Intervall zur selben Tageszeit wie bei Tod ausgewählt. Abbildung 36 zeigt je ein Beispiel für die Basalmessungen und für die EKG-Spur bei Tod. Verglichen wurden die Varianzen der R-R-Intervalle, eine kleine Varianz zeigt dabei einen regelmäßigen Herzrhythmus an, eine große Varianz deutet auf eine Arrhythmie hin. Wie Abbildung 36 zeigt, ist die Varianz der R-R-Intervalle basal sehr gering, die Abstände zwischen den R-Peaks sind also regelmäßig, kurz vor Tod zeigen die Versuchstiere dann aber starke Unregelmäßigkeiten im Herzschlag, die R-R-Varianz nimmt deutlich zu.

Ergebnisse

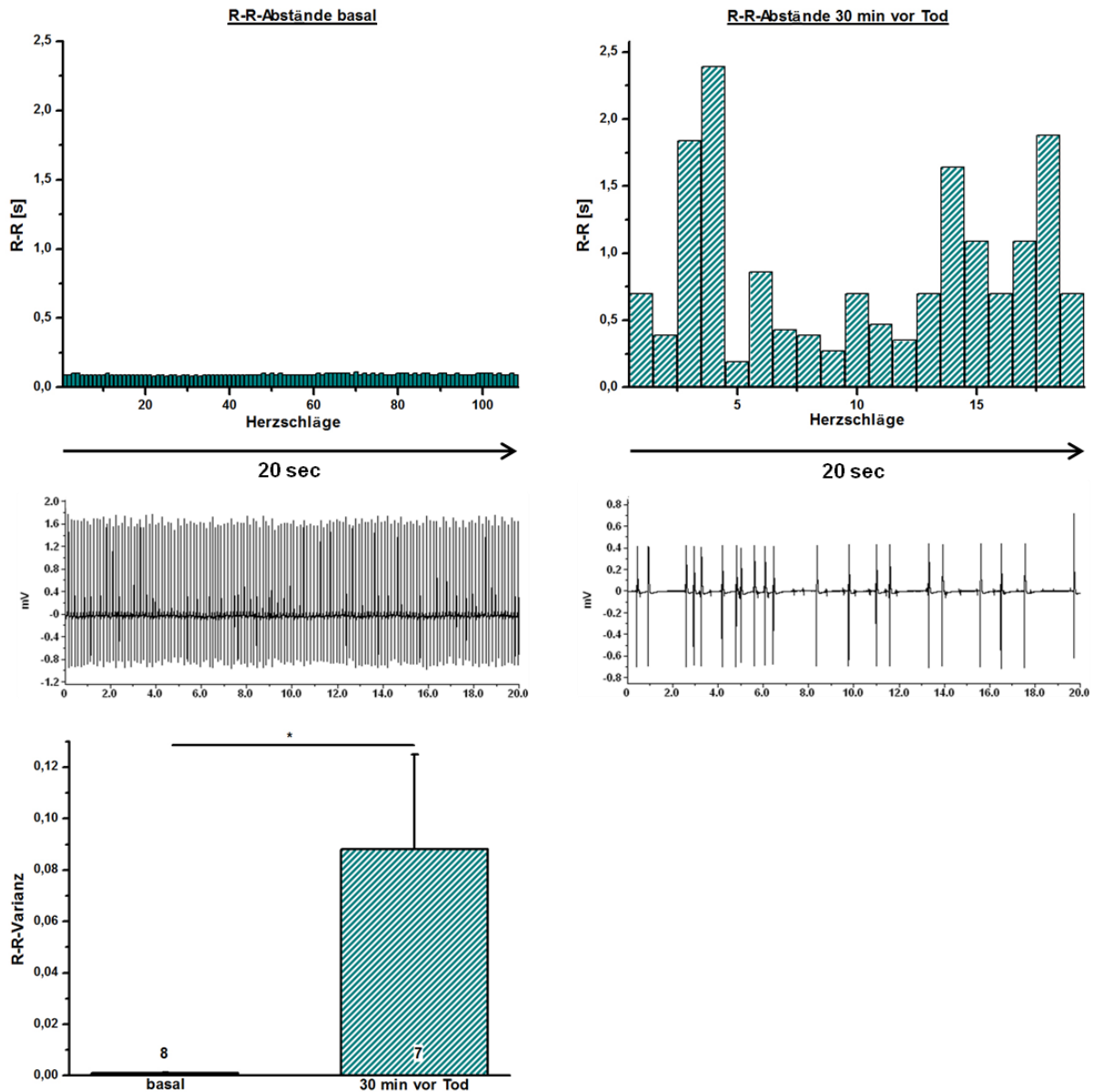


Abbildung 36 Oben links: R-R-Abstände basal und beispielhafte EKG-Spur basal. Oben rechts: R-R-Abstände 30 min vor Tod und EKG-Beispiel. Unten: R-R-Varianz basal und 30 min vor Tod.

3.3.8. Untersuchung isolierter Cardiomyocyten

3.3.8.1. Cardiomyocytengröße

Die Cardiomyocyten von Kontrolltieren und Versuchstieren wurden an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion isoliert wie zuvor unter 2.5.4 beschrieben. Nach 1 h Inkubation im Plating Medium wurden die Zellen mit 4% PFA in PBS fixiert und anschließend für eine Immuncytochemie mit $Ca_v1.2$ Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst eingefärbt. Mit dem konfokalen Mikroskop wurden die Zellen bei 63facher Vergrößerung gescannt, anschließend wurde die Myocytengröße vermessen und auf die Größe der Kontrollzellen normalisiert.

Ergebnisse

Wie Abbildung 37 zeigt, sind die Ventrikelzellen der Versuchstiere um rund 37% größer als die der Kontrolltiere. Insgesamt fließen 39 Zellen aus drei Kontrolltieren und 45 Zellen aus 5 Versuchstieren in die Statistik mit ein.

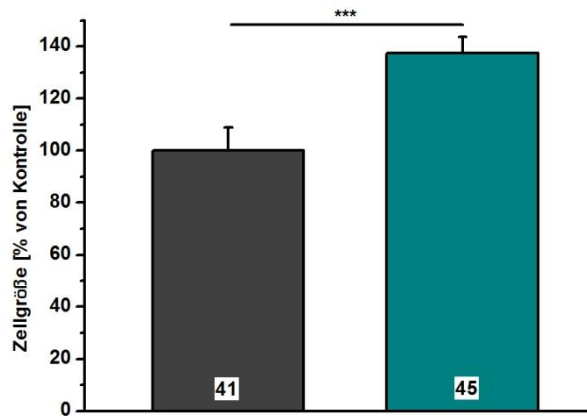


Abbildung 37 Cardiomyocytengröße von Versuchstieren und Kontrollen. Die Zellen wurden an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion isoliert. Vermessen wurde der Umfang der Zellen, angegeben als Prozent von Kontrolle.

3.3.8.2. $Ca_v1.2$ -Expression in isolierten Cardiomyocyten

Abbildung 38 zeigt exemplarische Aufnahmen der Cardiomyocyten von Kontrollen und Versuchstieren. Dabei wird deutlich, dass an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion ein Teil der aus den Versuchstieren isolierten Ventrikelzellen schon einen deutlichen Rückgang der $Ca_v1.2$ Expression zeigen, ein Teil der Zellen dagegen noch ein deutliches Signal aufweist.

Ergebnisse

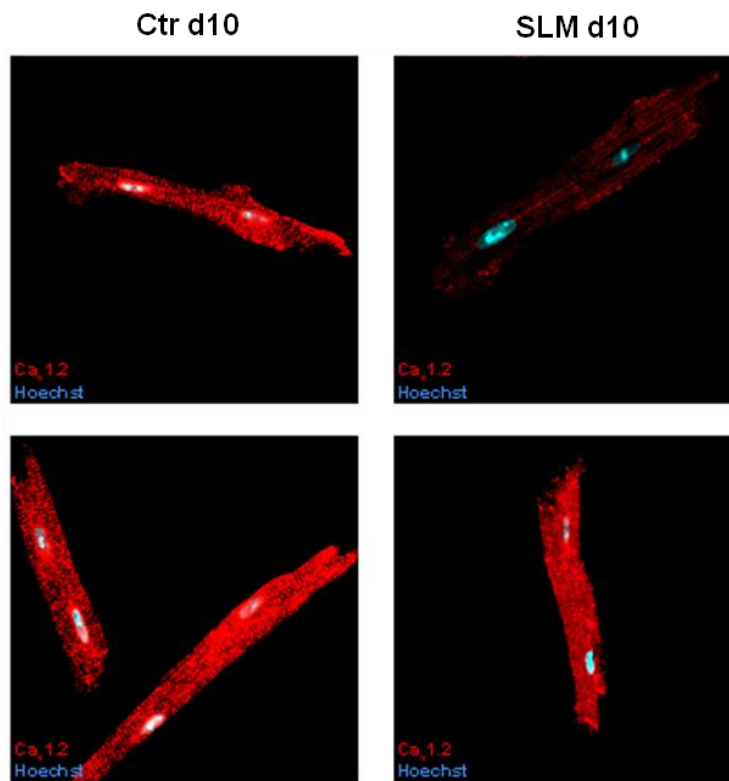


Abbildung 38 Ca_v1.2 Immuncytochemie auf Cardiomyocyten von Versuchstieren (rechts) und Kontrollen (links). Die Zellen wurden an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion isoliert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (Vergrößerung 63x).

4. Diskussion

4.1. Die Trunkierung von Ca_v1.2 *in vivo*

Die Trunkierung des Ca_v1.2 an seinem C-Terminus wurde bereits von einer großen Anzahl Arbeitsgruppen untersucht. Als Träger einer Vielzahl potentieller regulatorischer Strukturelemente wurden in Expressionsversuchen bereits zahlreiche Ergebnisse erzielt, die belegen, wie der C-Terminus die Funktion des Kanals beeinflusst (Bünemann et al. 1999, Davare et al. 2001, Dolmetsch et al. 2001, Dzhura et al. 2000, Fuller et al. 2010, Gao et al. 2000, Gao et al. 2001, Hulme et al. 2006, Jongh et al. 1996, Wei et al. 1994, Zühlke et al. 1999). Inwieweit diese *in vitro*-Experimente auch auf die Maus als Modellorganismus übertragbar sind, sollte nun an einer transgenen Mauslinie untersucht werden. Dazu wurden drei Stopcodons hinter Position Aspartat 1904 eingeführt, so dass die Translation an dieser Stelle abbricht und im Idealfall ein verkürztes, also trunkiertes Protein gebildet wird. Die Wahl der Mutationsstelle begründet sich aus der Literatur. Für *in vitro*-Experimente wurde bereits mehrfach diese Position als Trunkierungsstelle verwendet (Bünemann et al. 1999, Gao et al. 2000, Gao et al. 2001), darüber hinaus sollte durch die Trunkierung auch die AKAP150 -Bindungsstelle, nämlich das Leucin-Zippermotiv, entfernt werden. Über AKAP150 kann die cAMP-abhängige Proteinkinase A mit Ca_v1.2 interagieren und den Kanal regulieren. Verschiedene Veröffentlichungen lassen vermuten, dass dazu eine Trunkierung des C-Terminus notwendig ist (Bünemann et al. 1999, Fuller et al. 2010, Hulme et al. 2006). Daneben propagieren Gomez-Ospina et al. (Gomez-Ospina et al. 2006) ein 75 kDa großes Fragment des distalen C-Terminus, das vom Kanal abgespalten wird und im Kern als Transkriptionsfaktor fungiert. Da die veröffentlichten *in vitro*-Experimente gezeigt hatten, dass der trunkierte Kanal in HEK293-Zellen exprimiert wird und die Stromdichte gegenüber dem Wildtypkanal erhöht war, erwarteten wir für die Stop-Mauslinie ähnliche Ergebnisse. Im Gegensatz zu unseren Vermutungen starben die für die Mutation homozygoten Mäuse jedoch unmittelbar nach der Geburt und zeigten nur eine minimale Expression von Ca_v1.2. Die Stromdichte in embryonalen Cardiomyocyten, die aus Stop/Stop-Mäusen isoliert worden waren, war nicht erhöht, sondern im Gegenteil stark reduziert.

Wie Messungen des EKGs und der Herzmuskelkontraktionskraft zeigten, scheint die niedrige Kanalexpression zwar für die embryonale Entwicklung ausreichend zu sein, jedoch ist sie zu niedrig, um die Herzfrequenz auf den nach der Geburt physiologischen Level zu steigern (Corrigan et al. 2010, Porter & Rivkees 2001). Die Morphometrie der Stop-Herzen ergab im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen allerdings keinerlei signifikante Unterschiede. Fu et al. (Fu et al. 2011) erzielten ähnliche Ergebnisse, was Proteinlevel und Letalität einer Mauslinie mit C-terminal trunkiertem $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal betrifft, allerdings stellte diese Arbeitsgruppe eine Herzhypertrophie für ihre Mauslinie fest, was unsere morphometrischen Untersuchungen nicht bestätigen konnten. Die von Fu et al. verwendete Mauslinie trägt die Stop-Mutation jedoch auch schon an Position G1796, was eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Herzmorphometrie sein könnte. Verglichen mit Veröffentlichungen zu $\text{Ca}_v1.2$ -Totalknockoutmäusen, die embryonal letal sind und vor Tag 14,5 der Embryonalentwicklung sterben, wird bei den Stop-Embryonen die sehr niedrige Kanalexpression auch nicht durch eine Steigerung der $\text{Ca}_v1.3$ -Expression kompensiert (Seisenberger et al. 2000, Xu et al. 2003). Es scheint ebenfalls nicht von Belang zu sein, dass in den Stop-Embryonen der Kanal nur als trunkiertes Protein vorliegt.

Betrachtet man die Stromdichte in den isolierten Cardiomyocyten, so lag diese nicht wie erwartet weit über der Stromdichte in Wildtyp-Cardiomyocyten, vielmehr lag I_{Ba} in den Stop-Myocyten bei etwa 10% der Wildtypzellen. Der Grund dafür ist vermutlich ebenfalls in der sehr geringen Kanalexpression zu sehen. Die geringe Stromdichte in den Stop-Cardiomyocyten konnte in weiteren Experimenten durch den Proteasominhibitor Bortezomib deutlich gesteigert werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der trunkierte Kanal in Proteasomen abgebaut wird. Der Abbau in Proteasomen geschieht über die Ubiquitinierung des Kanals, die beispielsweise über sogenannte PEST-Sequenzen erfolgen kann, einem Aminosäuremotiv bestehend aus **P**rolin, **G**lutamat, **S**erin und **T**hreonin (Rechsteiner 1990). Der $\text{Ca}_v1.2$ enthält mehrere solcher PEST-Sequenzen, die potentielle Erkennungsmerkmale für proteolytischen Abbau darstellen (Catalucci et al. 2009), unter anderem auch zwei, die im C-Terminus lokalisiert sind und die sich beide kurz vor der Trunkierungsstelle befinden. Bortezomib ist ein Inhibitor des 26S-Proteasoms, indem es am katalytischen Zentrum des Enzyms angreift und so am Proteasom die Aufnahme und den Abbau ubiquitinierten Proteine hemmt.

Durch die Trunkierung des Kanals an Position Aspartat 1904 könnte eine solche Sequenz beispielsweise durch die veränderte Tertiärstruktur des Kanals demaskiert und so ein Angriffspunkt der Ubiquitinierung und damit des Abbaus des Kanals durch Proteasomen werden. Dies würde zum Einen den Abbau des trunkierten Kanals, zum Anderen die gesteigerte Stromdichte in den Bortezomib-behandelten Stop-Cardiomyocyten erklären.

4.2. Herzspezifische Trunkierung von $\text{Ca}_v1.2$

Die für das adulte Herz erzielten Ergebnisse bestätigen, dass der $\text{Ca}_v1.2$ essentiell für die Kontraktilität des Herzens ist. So zeigten die Versuchstiere bereits an Tag 10 nach der ersten Tamoxifen-Injektion eine deutliche Verschlechterung des Fractional Shortenings sowie eine Vergrößerung des Ventrikellumens. Die Proteinlevel für $\text{Ca}_v1.2$ nahmen stark ab und führten bei einem Rückgang auf etwa 30% des Wildtyplevels für den Kanal zum Tod der Tiere. Neben dem stark vergrößerten Lumen der beiden Ventrikel fiel auch eine Vergrößerung der Vorhöfe und massive Thrombenbildung auf, die wohl letztlich auch die Todesursache war. Durch die stark verminderte Herzkontraktilität kommt es zu einem verminderten Blutstrom, was eine Thrombenbildung begünstigt. Weiße Areale auf den Herzen verstorbener Versuchstiere deuten darauf hin, dass die Todesursache oftmals ein Herzinfarkt war. Im Falle der männlichen Versuchstiere dauerte es etwa 40 Tage von der ersten Tamoxifeninjektion bis zum Tod auch des letzten Versuchstieres, bei den weiblichen Tieren dauerte es etwa 70 Tage, bis alle verstorben waren. Dabei zeigten auch die Weibchen schon an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion ein deutlich verschlechtertes Fractional Shortening, trotzdem lebten sie im Schnitt etwa doppelt so lang wie die männlichen Versuchstiere. Aus der Literatur ist allerdings bereits bekannt, dass es bei Herzinsuffizienz geschlechtsspezifische Unterschiede im Überleben gibt (Adams et al. 1999, Ghali et al. 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass der im Vergleich zu Männern erhöhte Estrogenspiegel von Frauen einen Schutzmechanismus für das Herz darstellt (Schaible et al. 1984, Weinberg et al. 1999).

Auf Zellebene zeigten die Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop, dass die Menge an $\text{Ca}_v1.2$ -Protein an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich war.

Ein Teil der Zellen zeigte bereits einen starken Rückgang im Kanalprotein, während in anderen Zellen kaum ein Rückgang in der $\text{Ca}_v1.2$ -Expression zu detektieren war. Da der Turnover des Kanals bei etwa 5-7 Tagen liegt (Dobremez et al. 2005), sind diese Unterschiede wohl darauf zurückzuführen, dass die Cre-Rekombinase in den einzelnen Zellen unterschiedlich schnell und ausgeprägt arbeitet. Die durchschnittliche Zellgröße an Tag 10 nach der ersten Tamoxifeninjektion lag bei den Stop-Cardiomyocyten um etwa 37% über der von Kontrollzellen, obwohl die RT-PCR-Analyse auf Hypertrophiemarker keinen Hinweis auf eine vorliegende Hypertrophie gab.

Auch die Western Blot-Ergebnisse für phospho-MAPK zeigen eher einen Rückgang in der Zellproliferation, während bei einer Hypertrophie eine verstärkte Phosphorylierung der MAPK zu beobachten sein sollte (Gutkind & Offermanns 2009). Die Zunahme der Zellgröße scheint vielmehr auf eine Nekrose zurückzuführen zu sein, verursacht durch die verminderte Herzfunktion und die starke Herzdilatierung. Auch die Abnahme in Septum- und Wanddicke lassen sich durch Dilatierung und Nekrose erklären. Durch die zunehmende Schädigung der Cardiomyocyten wird die Kontraktionskraft des Herzens immer geringer, was schließlich zur Entstehung von Herzinfarkten und zum Tod der Tiere führt.

4.3. Trunkierte $\text{Ca}_v1.2$ -Varianten in HEK 293T-Zellen

Wie bereits erwähnt gibt es schon zahlreiche Veröffentlichungen zu trunkierten $\text{Ca}_v1.2$ -Konstrukten *in vitro*. Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt HK1Stop wurde aus Kaninchen-DNS hergestellt und trägt ein Stop-Codon an Position Serin 1905, dem Analogon zu Aspartat 1904 in der Mausequenz des Kanals. Ein an dieser Position trunkiertes Konstrukt war von Gao et al. (Gao et al. 2000, Gao et al. 2001) bereits an tsA201-Zellen untersucht worden, dementsprechend sollten mit HK1Stop diese Ergebnisse zunächst reproduziert werden.

Überraschenderweise war dies aber in keiner Hinsicht möglich, weder im Expressionsverhalten, das bei Gao et al. bei immerhin 70% des Wildtyps lag, noch bei der Stromdichte, die bei Gao im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war. Das in dieser Arbeit untersuchte HK1Stop-Konstrukt exprimierte äußerst schlecht in HEK 293T-Zellen und zeigte im Vergleich zu HK1 eine stark reduzierte Stromdichte.

Unter der Behandlung mit den Proteasominhibitoren Lactacystin und MG132 sowie Bortezomib konnten Expression und Stromdichte zwar gesteigert werden, die Größe des Kanalproteins lag mit etwa 150 kDa aber deutlich unter der erwarteten Größe. Offensichtlich lag auch für HK1Stop ein starker proteolytischer Abbau vor, dem durch die Anwendung von Proteasominhibitoren zumindest teilweise entgegengewirkt werden konnte. Die widersprüchlichen Ergebnisse im Vergleich zu Gao et al. konnten dadurch allerdings nicht erklärt werden. Erst mit einem zweiten Konstrukt eines trunkierten $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals, LK1Stop, konnten die Veröffentlichungen zumindest teilweise reproduziert werden. LK1Stop exprimierte vergleichbar zum Wildtypkanal LK1, wies im Western Blot eine verkürzte Bande auf der erwarteten Höhe auf und zeigte keine verringerte Stromdichte in der Elektrophysiologie.

Veröffentlichungen, wonach eine Inaktivierung des Kanals durch die Trunkierung aufgehoben und I_{Ba} dadurch stark erhöht sein sollte, konnten jedoch nicht bestätigt werden. Wir fokussierten uns zunächst auf das unterschiedliche Verhalten der beiden trunkierten Konstrukte. Der LK1-Vektor ist genau wie HK1 aus Kaninchen-DNS hergestellt, allerdings wurde die DNS hier aus Lunge isoliert, während HK1 auf DNS aus dem Herzen des Kaninchens beruht (Biel et al. 1990, Welling et al. 1997). Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz nur in vier Bereichen des Kanals und kommen durch alternatives Spleißen von *CACNA1C* zustande. LK1 weist einen im Vergleich zu HK1 verkürzten Aminoterminal auf und beinhaltet einen zusätzlichen Bereich in der cytoplasmatisch gelegenen Schleife zwischen Domäne I und Domäne II. Außerdem unterscheiden sich die Sequenzen in einem Bereich von Segment 6 der Domäne I und einem Teil von Segment 3 der Domäne 4. Unterschiede im Expressionsverhalten dieser beiden Isoformen waren bereits zuvor beobachtet worden (Welling et al. 1997). Besonders der in HK1 vorliegende längere N-Terminus beeinflusste die Expression des Kanals nachteilig. Auch Interaktionen des N-Terminus mit dem distalen C-Terminus, der β -Untereinheit und der intrazellulären I–II-Schleife sind schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden (Kobrinisky et al. 2004, Kobrinisky et al. 2005, Shistik et al. 1998), allerdings waren diese Interaktionen immer für die Inaktivierung des Kanals von Bedeutung, nicht aber für die Stromdichte in den Zellen. Auch dem C-Terminus wird eine ähnliche Rolle zugesprochen, Gao et al. (Gao et al. 2001) beschrieben für den Bereich zwischen den Aminosäuren 2024 und 2171 eine inhibitorische Funktion, indem diese Sequenz an einen ebenfalls C-terminal gelegenen Bereich proximal von der inhibitorischen Domäne bindet.

Dieser Bereich umfasst die Aminosäuren 1474 bis 1694 (Singh et al. 2006, Wahl-Schott et al. 2006), die in den trunkierten Konstrukten noch vorhanden sind. In der Nähe dieses Bereichs befinden sich zwei potentielle PEST-Sequenzen (Catalucci et al. 2009), die durch das C-terminale inhibitorische Fragment im Wildtypkanal maskiert werden könnten, durch die Trunkierung aber freiliegen.

Während der in LK1Stop vorliegende kurze N-Terminus über eine Konformationsänderung des Kanals die Ubiquitinierung verhindern könnte, fehlt in HK1Stop dieser Maskierungsmechanismus und es kommt zum proteolytischen Abbau des Kanals. Für diese Theorie sprechen auch die mit LK4Stop erzielten Resultate. LK4 ist ein Chimärvektor aus LK1 und HK1, der den LK1-Aminoterminal trägt, in den übrigen drei Spleißregionen entspricht er HK1-Vektor.

LK4Stop wurde von HEK 293T-Zellen auf einem zu LK1Stop vergleichbaren Level exprimiert und zeigte auch in der Elektrophysiologie ähnliche Ergebnisse. Somit konnte gezeigt werden, dass der trunkierte Kanal in Anwesenheit der kurzen Form des N-Terminus vor proteolytischem Abbau geschützt ist.

5. Zusammenfassung

Der Carboxyterminus des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Calciumkanals macht einen großen und funktionell wichtigen Bereich des Kanals aus. Er enthält diverse Phosphorylierungsstellen, ein Leucin-Zipper-Motiv, an das AKAP150 binden kann und so eine Interaktion zwischen $\text{Ca}_v1.2$ und der Proteinkinase A ermöglicht, sowie das IQ-Motiv, dem eine wichtige Rolle für die Fazillitierung zugesprochen wird (Blaich et al. 2010). Für den distalen Teil des C-Terminus wurde außerdem gezeigt, dass dieser nach Abspaltung vom Kanal im Zellkern an nukleäre Proteine bindet und so über einen endogenen Promotor die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren kann (Dolmetsch et al. 2001). Außerdem spielt der C-Terminus in der Inaktivierung des Kanals eine wichtige Rolle (Davare et al. 2001, Fuller et al. 2010, Hulme et al. 2006, Jongh et al. 1996, Zühlke et al. 1999).

Bereits früher wurde anhand von *in vitro* Experimenten gezeigt, dass die Trunkierung des $\text{Ca}_v1.2$ zu einer leicht verringerten Expression des Kanals sowie zu einer starken Zunahme in der Stromdichte führt (Bünemann et al. 1999, Gao et al. 2000, Gao et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Auswirkungen einer Trunkierung *in vivo* an einem transgenen Mausmodell gezeigt werden.

Dazu wurde eine Mauslinie erzeugt, die drei Stopcodons hinter dem für Aspartat1904 codierenden Basentriplett trägt, was zu einer Trunkierung des Kanalproteins an dieser Stelle führt. Die homozygoten Nachkommen dieser Mauslinie erwiesen sich als nicht lebensfähig und starben bei Geburt, bis zu diesem Zeitpunkt lagen sie allerdings in Mendelschen Verhältnissen vor. Die Stop-Embryonen unterschieden sich äußerlich nicht von ihren heterozygoten oder Wildtyp-Geschwistern, auch für die Herzmorphometrie und der mRNS-Level des für $\text{Ca}_v1.2$ codierenden Gens ergaben sich keine Unterschiede. Auf Proteinebene war die Kanalexpression bei den Stop-Homozygoten im Vergleich zu Wildtypen und Heterozygoten stark reduziert, ebenso die an isolierten Cardiomyocyten gemessenen Bariumströme. Die Herzen der Stop-Embryonen zeigten eine deutlich verminderte Herzkontraktionskraft und konnten die Herzfrequenz nach Geburt nicht auf physiologische Level steigern.

In einem weiteren Mausmodell mit induzierbarer herzspezifischer Trunkierung des $\text{Ca}_v1.2$ konnte bestätigt werden, dass eine Trunkierung des Kanals im Herzen zu einem starken Rückgang der $\text{Ca}_v1.2$ -Expression, einer verminderten Kontraktionskraft und letztlich zum Tod der Tiere durch Herzinfarkt oder Herzversagen führt.

Diese Ergebnisse waren nach aus der Literatur bekannten *in vitro* Untersuchungen überraschend (Bünemann et al. 1999, Gao et al. 2000, Gao et al. 2001). In einer Reihe von Untersuchungen an in HEK 293T-Zellen exprimierten trunkierten Isoformen des Ca_v1.2 konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression des Kanalproteins sehr von der für die Trunkierung verwendeten Isoform abhängt (Welling et al. 1997). Während eine Trunkierung von HK1 (HK1Stop), der herzspezifischen Ca_v1.2 Isoform, zu einer um etwa 95% verringerten Proteinexpression des Kanals und zu minimalen Bariumströmen führte, war bei Verwendung einer trunkierten Form von LK1 (LK1Stop), einer aus der Kaninchenlunge isolierten Isoform, die Kanalexpression in HEK-Zellen kaum reduziert, die Stromdichte entsprach dem Wildtypkanal. Durch die Verwendung von Proteasominhibitoren konnten Expression und Stromdichte für HK1Stop deutlich gesteigert werden, daher war anzunehmen, dass die Trunkierung des Kanals bei dieser Isoform zu einem proteolytischen Abbau führt. Mit Hilfe eines weiteren Konstrukts LK4 (Welling et al. 1997), einem Chimärkonstrukt aus HK1 und LK1, konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Spleißvarianten für den N-Terminus des Kanals eine maßgebliche Bedeutung für die Expression der unterschiedlichen trunkierten Isoformen haben. HK1Stop trägt eine im Vergleich zu LK1Stop längere Spleißvariante des N-Terminus, das verwendete LK4Stop-Konstrukt entspricht HK1Stop, allerdings mit der kürzeren LK1-Variante des N-Terminus. Dadurch war der Kanal vor proteolytischem Abbau geschützt.

Auch an aus Stop-Embryonen isolierten Cardiomyozyten konnte der Einsatz von Proteasominhibitoren die Stromdichte deutlich steigern, so dass auch hier ein proteolytischer Abbau des trunkierten Kanals gezeigt werden konnte.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Trunkierung des Ca_v1.2 *in vivo* zu einer starken Beeinträchtigung der Herzfunktion und letztlich zum Tod führt, verursacht durch proteolytischen Abbau des trunkierten Kanals. *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass der trunkierte Kanal in Anwesenheit der kürzeren Form seines N-Terminus vor proteolytischem Abbau geschützt ist.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, K. F., Sueta, C. A., Gheorghiade, M., O'Connor, C. M., Schwartz, T. A., Koch, G. G., Uretsky, B., Swedberg, K., McKenna, W., Soler-Soler, J. & Califf, R. M. (1999), 'Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the FIRST study.', *Circulation* **99**(14), 1816–1821.
- Bers, D. M. (2002), 'Cardiac excitation-contraction coupling.', *Nature* **415**(6868), 198–205.
- Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stühmer, W., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1990), 'Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung.', *FEBS Lett* **269**(2), 409–412.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979), 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.', *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513–1523.
- Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Wegener, J. W., Köstner, K., Hofmann, F. & Moosmang, S. (2010), 'Facilitation of murine cardiac L-type $\text{Ca}_v1.2$ channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(22), 10285–10289.
- Bünemann, M., Gerhardstein, B. L., Gao, T. & Hosey, M. M. (1999), 'Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 subunit.', *J Biol Chem* **274**(48), 33851–33854.
- Bootman, M. D. & Berridge, M. J. (1995), 'The elemental principles of calcium signaling', *Cell* **83**, 675–678.
- Burnette, W. N. (1981), "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.', *Anal Biochem* **112**(2), 195–203.
- Catalucci, D., Zhang, D.-H., DeSantiago, J., Aimond, F., Barbara, G., Chemin, J., Bonci, D., Picht, E., Rusconi, F., Dalton, N. D., Peterson, K. L., Richard, S., Bers, D. M., Brown, J. H. & Condorelli, G. (2009), 'Akt regulates L-type Ca^{2+} channel activity by modulating $\text{Ca}_v\alpha_1$ protein stability.', *J Cell Biol* **184**(6), 923–933.
- Catterall, W. A. (2000), 'Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels.', *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521–555.
- Clapham, D. E. (2007), 'Calcium signaling', *Cell* **131**, 1047–1058.
- Corrigan, N., Brazil, D. P. & Auliffe, F. M. (2010), 'High-frequency ultrasound assessment of the murine heart from embryo through to juvenile.', *Reprod Sci* **17**(2), 147–157.
- Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M. & Perez-Reyes, E. (1998), 'Cloning and characterization of α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family', *Circ Res* **83**, 103–109.

- Davare, M. A., Avdonin, V., Hall, D. D., Peden, E. M., Burette, A., Weinberg, R. J., Horne, M. C., Hoshi, T. & Hell, J. W. (2001), 'A β_2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel $\text{Ca}_v1.2$.', *Science* **293**(5527), 98–101.
- Dobremetz, E., Bouali-Benazzouz, R., Fossat, P., Monteils, L., Dulluc, J., Nagy, F. & Landry, M. (2005), 'Distribution and regulation of L-type calcium channels in deep dorsal horn neurons after sciatic nerve injury in rats.', *Eur J Neurosci* **21**(12), 3321–3333.
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M. & Greenberg, M. E. (2001), 'Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the map kinase pathway.', *Science* **294**(5541), 333–339.
- Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R. J., Balser, J. R. & Anderson, M. E. (2000), 'Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels.', *Nat Cell Biol* **2**(3), 173–177.
- Echtler, K., Stark, K., Lorenz, M., Kerstan, S., Walch, A., Jennen, L., Rudelius, M., Seidl, S., Kremmer, E., Emambokus, N. R., von Bruehl, M.-L., Frampton, J., Isermann, B., Genzel-Boroviczeny, O., Schreiber, C., Mehilli, J., Kastrati, A., Schwaiger, M., Shivdasani, R. A. & Massberg, S. (2010), 'Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus.', *Nat Med* **16**(1), 75–82.
- Fu, Y., Westenbroek, R. E., Yu, F. H., Clark, J. P., Marshall, M. R., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2011), 'Deletion of the distal C terminus of $\text{Ca}_v1.2$ channels leads to loss of β -adrenergic regulation and heart failure in vivo.', *J Biol Chem* **286**(14), 12617–12626.
- Fuller, M. D., Emrick, M. A., Sadilek, M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2010), 'Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response.', *Sci Signal* **3**(141), ra70.
- Gao, T., Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Ma, H. & Hosey, M. M. (2000), 'Role of the C terminus of the α_{1C} ($\text{Ca}_v1.2$) subunit in membrane targeting of cardiac L-type calcium channels.', *J Biol Chem* **275**(33), 25436–25444.
- Gao, T., Chien, A. J. & Hosey, M. M. (1999), 'Complexes of the α_{1C} and β subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels.', *J Biol Chem* **274**(4), 2137–2144.
- Gao, T., Cuadra, A. E., Ma, H., Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Cheng, T., Eick, R. T. & Hosey, M. M. (2001), 'C-terminal fragments of the α_{1C} ($\text{Ca}_v1.2$) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated α_{1C} subunits.', *J Biol Chem* **276**(24), 21089–21097.
- Ghali, J. K., Krause-Steinrauf, H. J., Adams, K. F., Khan, S. S., Rosenberg, Y. D., Yancy, C. W., Young, J. B., Goldman, S., Peberdy, M. A. & Lindenfeld, J. (2003), 'Gender differences in advanced heart failure: insights from the BEST study.', *J Am Coll Cardiol* **42**(12), 2128–2134.
- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L. & Dolmetsch, R. (2006), 'The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel $\text{Ca}_v1.2$ encodes a transcription factor.', *Cell* **127**(3), 591–606.

- Gutkind, J. S. & Offermanns, S. (2009), 'A new G_q-initiated MAPK signaling pathway in the heart.', *Dev Cell* **16**(2), 163–164.
- Guy, H. R. & Conti, F. (1990), 'Pursuing the structure and function of voltage-gated channels.', *Trends Neurosci* **13**(6), 201–206.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981), 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.', *Pflügers Arch* **391**(2), 85–100.
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Warner, C., Ahljianian, M. K., Prystay, W., Gilbert, M. M., Snutch, T. P. & Catterall, W. A. (1993), 'Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel α_1 subunits.', *J Cell Biol* **123**(4), 949–962.
- Hofmann, F., Lacinová, L. & Klugbauer, N. (1999), 'Voltage-dependent calcium channels: from structure to function.', *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**, 33–87.
- Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W.-C., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2006), 'Autoinhibitory control of the Ca_v1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain.', *J Physiol* **576**(Pt 1), 87–102.
- Jing, X., Li, D.-Q., Olofsson, C. S., Salehi, A., Surve, V. V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., Rorsman, P. & Renström, E. (2005), 'Ca_v2.3 calcium channels control second-phase insulin release.', *J Clin Invest* **115**(1), 146–154.
- Jongh, K. S. D., Murphy, B. J., Colvin, A. A., Hell, J. W., Takahashi, M. & Catterall, W. A. (1996), 'Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the α_1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase.', *Biochemistry* **35**(32), 10392–10402.
- Jongh, K. S. D., Warner, C., Colvin, A. A. & Catterall, W. A. (1991), 'Characterization of the two size forms of the α_1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23), 10778–10782.
- Kobrinisky, E., Kepplinger, K. J. F., Yu, A., Harry, J. B., Kahr, H., Romanin, C., Abernethy, D. R. & Soldatov, N. M. (2004), 'Voltage-gated rearrangements associated with differential β -subunit modulation of the L-type Ca²⁺ channel inactivation.', *Biophys J* **87**(2), 844–857.
- Kobrinisky, E., Tiwari, S., Maltsev, V. A., Harry, J. B., Lakatta, E., Abernethy, D. R. & Soldatov, N. M. (2005), 'Differential role of the α_{1C} subunit tails in regulation of the Ca_v1.2 channel by membrane potential, β subunits, and Ca²⁺ ions.', *J Biol Chem* **280**(13), 12474–12485.
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature* **227**(5259), 680–685.
- Lee, T.-S., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T. & Welling, A. (2006), 'Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Ca_v1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites.', *J Biol Chem* **281**(35), 25560–25567.

- Letts, V. A., Felix, R., Biddlecome, G. H., Arikath, J., Mahaffey, C. L., Valenzuela, A., Bartlett, F. S., Mori, Y., Campbell, K. P. & Frankel, W. N. (1998), 'The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel gamma subunit.', *Nat Genet* **19**(4), 340–347.
- McCleskey, E. W., Fox, A. P., Feldman, D. H., Cruz, L. J., Olivera, B. M., Tsien, R. W. & Yoshikami, D. (1987), 'Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(12), 4327–4331.
- McRory, J. E., Hamid, J., Doering, C. J., Garcia, E., Parker, R., Hamming, K., Chen, L., Hildebrand, M., Beedle, A. M., Feldcamp, L., Zamponi, G. W. & Snutch, T. P. (2004), 'The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution.', *J Neurosci* **24**(7), 1707–1718.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. & Numa, S. (1989), 'Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel.', *Nature* **340**(6230), 230–233.
- Moosmang, S., Lenhardt, P., Haider, N., Hofmann, F. & Wegener, J. W. (2005), 'Mouse models to study L-type calcium channel function', *Pharmacol Ther* **106**, 347–355.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., Hofmann, F. & Klugbauer, N. (2003), 'Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel $\text{Ca}_v1.2$ for blood pressure regulation.', *EMBO J* **22**(22), 6027–6034.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M. S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V. & Furuichi, T. (1991), 'Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel.', *Nature* **350**(6317), 398–402.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987), 'Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.', *Methods Enzymol* **155**, 335–350.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. (1993), 'Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18), 8424–8428.
- Niidome, T., Kim, M. S., Friedrich, T. & Mori, Y. (1992), 'Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain.', *FEBS Lett* **308**(1), 7–13.
- Perez-Reyes, E. (1998), 'Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels', *J Bioenerg Biomembr* **30**, 313–318.
- Porter, G. A. & Rivkees, S. A. (2001), 'Ontogeny of humoral heart rate regulation in the embryonic mouse.', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**(2), R401–R407.
- Pragnell, M., Waard, M. D., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P. & Campbell, K. P. (1994), 'Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit.', *Nature* **368**(6466), 67–70.

- Rechsteiner, M. (1990), 'PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis.', *Semin Cell Biol* **1**(6), 433–440.
- Roberts, R. J. (1976), 'Restriction endonucleases.', *CRC Crit Rev Biochem* **4**(2), 123–164.
- Schaible, T. F., Malhotra, A., Ciambone, G. & Scheuer, J. (1984), 'The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats.', *Circ Res* **54**(1), 38–49.
- Schneider, D. J. & Moore, J. W. (2006), 'Patent ductus arteriosus.', *Circulation* **114**(17), 1873–1882.
- Schulla, V., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.-J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M. A., Obermüller, S., Olofsson, C. S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C. B., Rorsman, P. & Hofmann, F. (2003), 'Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} channel null mice.', *EMBO J* **22**(15), 3844–3854.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J. H. & Bell, G. I. (1992), 'Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(2), 584–588.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzner, J., Pfeifer, A., Kühbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R. & Hofmann, F. (2000), 'Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type α_{1C} ($\text{Ca}_v1.2$) calcium channel gene in the mouse.', *J Biol Chem* **275**(50), 39193–39199.
- Shistik, E., Ivanina, T., Blumenstein, Y. & Dascal, N. (1998), 'Crucial role of n terminus in function of cardiac L-type Ca^{2+} channel and its modulation by protein kinase C.', *J Biol Chem* **273**(28), 17901–17909.
- Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M. & Dascal, N. (1995), ' Ca^{2+} current enhancement by $\alpha_2\delta$ and β subunits in xenopus oocytes: contribution of changes in channel gating and α_1 protein level.', *J Physiol* **489** (Pt 1), 55–62.
- Singh, A., Hamedinger, D., Hoda, J.-C., Gebhart, M., Koschak, A., Romanin, C. & Striessnig, J. (2006), 'C-terminal modulator controls Ca^{2+} -dependent gating of $\text{Ca}_v1.4$ L-type Ca^{2+} channels.', *Nat Neurosci* **9**(9), 1108–1116.
- Starr, T. V., Prystay, W. & Snutch, T. P. (1991), 'Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13), 5621–5625.
- Striessnig, J. (1999), 'Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca^{2+} channels.', *Cell Physiol Biochem* **9**(4-5), 242–269.
- Strom, T. M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B. H., Wutz, K., Gutwilling, N., Rüther, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A. & Meindl, A. (1998), 'An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness.', *Nat Genet* **19**(3), 260–263.

- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1987), 'Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle.', *Nature* **328**(6128), 313–318.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979), 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9), 4350–4354.
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R. & Fox, A. P. (1988), 'Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation.', *Trends Neurosci* **11**(10), 431–438.
- Wahl-Schott, C., Baumann, L., Cuny, H., Eckert, C., Griessmeier, K. & Biel, M. (2006), 'Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(42), 15657–15662.
- Wei, X., Neely, A., Lacerda, A. E., Olcese, R., Stefani, E., Perez-Reyes, E. & Birnbaumer, L. (1994), 'Modification of Ca^{2+} channel activity by deletions at the carboxyl terminus of the cardiac α_1 subunit.', *J Biol Chem* **269**(3), 1635–1640.
- Weinberg, E. O., Thienelt, C. D., Katz, S. E., Bartunek, J., Tajima, M., Rohrbach, S., Douglas, P. S. & Lorell, B. H. (1999), 'Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy.', *J Am Coll Cardiol* **34**(1), 264–273.
- Welling, A., Ludwig, A., Zimmer, S., Klugbauer, N., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1997), 'Alternatively spliced IS6 segments of the α_{1C} gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca^{2+} channels.', *Circ Res* **81**(4), 526–532.
- Xu, M., Welling, A., Paparisto, S., Hofmann, F. & Klugbauer, N. (2003), 'Enhanced expression of L-type $\text{Ca}_v1.3$ calcium channels in murine embryonic hearts from $\text{Ca}_v1.2$ -deficient mice.', *J Biol Chem* **278**(42), 40837–40841.
- Yaari, Y., Hamon, B. & Lux, H. D. (1987), 'Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons', *Science* **235**, 680–682.
- Zühlke, R. D., Pitt, G. S., Deisseroth, K., Tsien, R. W. & Reuter, H. (1999), 'Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels.', *Nature* **399**(6732), 159–162.
- Zühlke, R. D., Pitt, G. S., Tsien, R. W. & Reuter, H. (2000), ' Ca^{2+} -sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca^{2+} channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the α_{1C} subunit.', *J Biol Chem* **275**(28), 21121–21129.

Anhang

Primer	
Exon38_for	5' GAA ATT GTG TCC TCA CCG 3'
Exon39_rev	5' ACT GTG ACC TCG TCA TCG 3'
Exon40_for	5' AGA GGA CTA GCA TGA AGC 3'
Exon41_rev	5' AGT AGG TGA CAT GGT TGC 3'
Exon42_for	5' AAG GCT ATG AAG GAG GCG 3'
Exon43_rev	5' CGG TGT TCA TCT TCC TGG 3'
Exon44_for	5' GAA GAA GCC GAG TAC TGC 3'
Exon45_rev	5' CCT GGG GAA TGT GGT AGG 3'
Exon46_for	5' TCT GGT TCA TCA TCA GGC 3'
Exon47_rev	5' CTG AGG ACT ACA GGT TGC 3'
ANP_for	5' CTC CTT CTC CAT CAC CCT G 3'
ANP_rev	5' GTT GAC CTC CCC AGT CCA 3'
BNP_for	5' TCC TAG CCA GTC TCC AGA GC 3'
BNP_rev	5' AGA CCC AGG CAG AGT CAG AA 3'
SERCA_for	5' CTT GGT AGC CAA TGC AAT CG 3'
SERCA_rev	5' TAG CTT TCC CAG CAG CAA TG 3'
Myh6_for	5' GGT CAC CAA CAA CCC ATA CG 3'
Myh6_rev	5' CAG GGT TGC GTT GAT GC 3'
Myh7_for	5' GAA GGA GGA CCA GGT GAT G 3'
Myh7_rev	5' TGA CAG TCT TCC CAG CTC C 3'
Ca _v 1.2_for	5' CAG GAG GTG ATG GAG AAG CCA 3'
Ca _v 1.2_rev	5' CTG CAG GCG GAA CCT GTT GTT 3'
Ca _v 1.3_for	5' GGG GTC CAG CTG TTC AAG GGG GAA 3'
Ca _v 1.3_rev	5' GCA TGA TGA GGA CGA ACA TCA TG 3'
HPRT_for	5' GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC 3'
HPRT_rev	5' CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA 3'
GAPDH_for	5' CGG CAA ATT CAA CGG CAC AGT CA 3'
GAPDH_rev	5' GGT TTC TCC AGG CGG CAC GTC A 3'

Genotypisierungsprimer		
Primer	Sequenz	Mauslinie
Stop_for	5' GAC CCT TGT GTA GAG AGT GAG CC 3'	Ca _v 1.2Stop
Stop_rev	5' CAA AAG TAG CCG GGG AAC CG 3'	Ca _v 1.2Stop
VI4	5' TGG CCC CTA AGC AAT GA 3'	Ca _v 1.2
VI8	5' AGG GGT GTT CAG AGC AA 3'	Ca _v 1.2
VI10	5' CCC CAG CCA ATA GAA TGC CAA 3'	Ca _v 1.2
Cre800	5' GCT GCC ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG 3'	MerCreMer
Cre1200	5' GTA GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC AC 3'	MerCreMer
GABA1_for	5' AAC ACA CAC TGG AGG ACT GGC TAG G 3'	MerCreMer
GABA1_rev	5' CAA TGG TAG GCT CAC TCT GGG AGA TGA TA 3'	MerCreMer

Anhang

Restriktionsenzyme		
Enzym	Schnittstelle	Hersteller
XbaI	T/CTAGA	NEB
EcoRV	GAT/ATC	NEB

Primäre Antikörper			
Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Referenz
Ca _v 1.2	Polyklonal, Kaninchen	1:250	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TUM
Ca _v 1.3	Polyklonal, Kaninchen	1:200	Millipore
GAPDH	Polyklonal, Kaninchen	1:5000	Sigma
P44/42 MAPK	Polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signalling
Phospho-MAPK	Polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell signalling

Sekundäre Antikörper			
Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Referenz
Anti-Kaninchen (Peroxidase-gekoppelt)	Ziege	1:50000	Dianova
Cy ³ Anti Kaninchen	Ziege	1:1000	Dianova

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Herrn Prof. Dr. Hofmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die engagierte Betreuung dieser Arbeit und all die Ideen und Anregungen, mit denen er mich und dieses Projekt unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die unkomplizierte Übernahme der offiziellen Betreuung dieser Arbeit und die Berichterstattung vor der Fakultät.

Bei Frau Dr. Anne Blaich, die mir so Vieles beigebracht hat. Ein ganz, ganz großes Dankeschön für deine Geduld und Unterstützung, die vielen guten Ideen und Anregungen, wenn ich mal nicht weiter wusste und dass du jederzeit ein offenes Ohr für mich hast!

Bei Herrn Jie Ding für die Durchführung und bei Herrn PD Dr. Jörg Wegener für die Betreuung der elektrophysiologischen Untersuchungen.

Bei Herrn PD Dr. Sven Moosmang, der die hier verwendete Stop-Mauslinie zur Verfügung gestellt hat, für die gute Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. Katrin Echtler, von der ich das Anfärben des Ductus botalli lernen durfte.

Ein riesengroßes Dankeschön an Bea, Julia und Angela für ihre Freundschaft, die oftmals geleistete Aufbauarbeit, ihre Unterstützung und die vielen lustigen oder auch mal ernsten Gespräche. Ebenso an Steffi und Carl, die mich zu Beginn meiner Doktorarbeit so lieb aufgenommen haben und von denen ich Vieles gelernt habe. Danke euch Allen für die vielen lustigen Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts.

Unserer morgendlichen Frühstücksrunde Anne, Bea, Enrico und Tea, die dazu beigetragen hat, so manchen langen Arbeitstag leichter zu überstehen.

Memo, unserem guten Laborgeist, weil er sich zuverlässig um die ganzen Kleinigkeiten in Labor und Tierstall kümmert und dabei immer gute Laune hinterlässt.

Bei allen Mitgliedern der AG Hofmann und den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für das angenehme Arbeitsklima, die gegenseitige Unterstützung im Laboralltag und die schöne Zeit, die ich hier verbringen durfte.

Zu guter Letzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern und meinen Brüdern für ihren fortwährenden Glauben an mich, ihre Unterstützung und den unendlichen Rückhalt, den sie mir in dieser Zeit gegeben haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Domes
Geburtsdatum	18. September 1983
Geburtsort	Schrobenhausen
Familienstand	Ledig

Schulbildung

1989–1993	Johann-Andreas-Schmeller-Grundschule Scheyern
1993–2002	Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen a.d. Ilm
	Abschluss: Abitur

Studium

Oktober 2002–Oktober 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
	Abschluss: 2. Staatsexamen

Pharmaziepraktikum

November 2006–April 2007	Hexal AG, Holzkirchen
Mai 2007–Oktober 2007	Schyrenapotheke, Pfaffenhofen a.d. Ilm
08. Februar 2008	Approbation als Apothekerin

Promotion

Januar 2008–heute	Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München
-------------------	---

Thema:	Analyse der Funktion des C-Terminus des Ca _v 1.2 L-Typ Calciumkanals <i>in vitro</i> und im Mausmodell
--------	---

München, den 10.06.2011